

PROTEÍNA TERAPÉUTICA MULTIDOMINIO QUE
COMPRENDE UN SCFV ANTI-HTFR, UN SCFV ANTI-HCD63 Y UN DOMINIO
ENZIMÁTICO GAA

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO COMO UN ARCHIVO

5 DE TEXTO A TRAVÉS DE EFS- WEB

El listado de secuencias escrito en el archivo 10457WO01_ST25.txt es de 33.5 kilobytes, se creó el 29 de enero de 2019, y se incorpora a la presente descripción como referencia.

CAMPO

Esta solicitud se refiere generalmente a composiciones y métodos para entregar una proteína
10 terapéutica al sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés), con el objetivo de tratar enfermedades y trastornos que afectan al CNS, tal como el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Esta solicitud se refiere a proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de nucleótido que codifica una proteína terapéutica conjugada a uno o más dominios de entrega que cruza la barrera hematoencefálica
15 (BBB, por sus siglas en inglés).

ANTECEDENTES

Se han desarrollado enfoques de entrega de fármacos para superar la barrera hematoencefálica (BBB), tales como nanoportadores, sin embargo, tienen deficiencias. Los portadores han exhibido inestabilidad en la circulación sanguínea y perfil de biodistribución no deseado (Gelperina S, et al., 2005, *Am J Respir Crit Care Med.* 172(12):1487-90; cuya
20 referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Las eficiencias de direccionamiento también se han comprometido dependiendo de los mecanismos de tráfico en la BBB y si un estado de enfermedad del CNS ha alterado la integridad de la barrera. La selección apropiada del portador o la fracción de direccionamiento debe tener en
25 cuenta las condiciones neuroinflamatorias que efectúan estos mecanismos de tráfico. La entrega de proteínas terapéuticas por medio de la expresión del ADN en el hígado u otros

tejidos ha proporcionado un enfoque conveniente para eliminar la necesidad de inyección en bolo de proteína y por lo tanto disminuir las preocupaciones de inmunogenia. La proteína terapéutica conjugada a una proteína de unión a receptores, especialmente a un receptor específico de células, resuelve el problema de dirigir productos terapéuticos a tejidos

5 específicos. Sin embargo, aún existe la necesidad de proporcionar métodos que proporcionen eficazmente productos terapéuticos al CNS.

COMPENDIO

Los solicitantes han descubierto que las proteínas terapéuticas, especialmente las enzimas de reemplazo, pueden entregarse eficazmente en el sistema nervioso central cuando se asocian

10 con una proteína de unión a receptores y siempre que los niveles de circulación sanguínea alcancen niveles consistentes en el tiempo. La proteína terapéutica multidominio puede entregarse al hígado a través de un vector de terapia génica que alberga la secuencia codificante de la proteína terapéutica y el complejo de proteína de unión.

En un aspecto, la invención proporciona un método para entregar una proteína terapéutica al

15 sistema nervioso central (CNS) de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de nucleótido que codifica la proteína terapéutica conjugada a una proteína de unión a receptores de la superficie celular (CSR, por sus siglas en inglés) (CSR-BP, por sus siglas en inglés) (tpCSR-BP) mediante un método de entrega dirigido al hígado suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la tpCSR-BP en el CNS.

20 En una modalidad, la CSR-BP es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente al CSR. En otra modalidad, la proteína terapéutica es una enzima lisosómica.

En una modalidad, la enzima tiene actividad de hidrolasa, tal como una glicosilasa, tal como una glucosidasa, tal como una alfa-glucosidasa o alfa-galactosidasa A. En una modalidad, la

25 proteína de unión a receptores de la superficie celular (CSR) (CSR-BP) es una proteína de

unión a antígenos que se une a un receptor de internalización. En una modalidad, el receptor de internalización es una molécula de superficie celular que se endocita y se trafica al lisosoma. En una modalidad específica, el receptor de internalización es una molécula de CD63. En una modalidad, el receptor de internalización es una molécula ITGA7. En una modalidad específica, la CSR-BP es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o un fragmento variable de cadena simple (scFv), tal como un scFv que se une a CD63 o ITGA7.

En algunas modalidades, una proteína terapéutica multidominio descrita en la presente descripción comprende uno o más dominios de entrega y un dominio enzimático, en donde el uno o más dominios de entrega se unen al receptor de transferrina humana (hTfR). En algunas

modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende además un segundo dominio de entrega que se une a un efector de internalización. En algunas modalidades, el segundo dominio de entrega se une a (i) un efector de internalización seleccionado del grupo que consiste en CD63, Integrina alfa-7 (ITGA7), MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), proteína de mielina y linfocitos (MAL), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, y CD36; (ii) un efector de

internalización expresado en varios tipos de tejido, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CD63, MHC-I, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, IGF2R, Integrina alfa-7 (ITGA7), LRP5, LRP6, LRP8, Kremen-2, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR, MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), receptores de toxina diftérica, HBEGF (factor de crecimiento tipo EGF que se une a heparina), receptores de glutatona, receptores de glutamato, receptores de leptina, y receptores de folato; (iii) un efector de internalización

preferentemente expresado por un hueso y/o cartílago, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en Colágeno X, Integrina alfa 10 (ITGA10), receptor 3 de factor de crecimiento de Fibroblastos (FGFR3), isoforma C de receptor de factor de crecimiento de Fibroblastos (FGFR3C), proteína 1 de enlace a Hialuronano y proteoglicano (CRTL1), Agrecano, Colágeno II, y Kremen-1; (iv) un efector de internalización preferentemente expresado por monocitos, macrófagos, o microglía, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, CD36, MSR1 (receptor depurador 1 de macrófagos), MRC1 (receptor 1 de manosa de macrófagos), VSIG4 (proteína 4 que contiene dominio de V-set e inmunoglobulina), CD68 (Macrosialina), y CSF1R (receptor de factor 1 de estimulación de colonia de macrófagos); (v) un efector de internalización preferentemente expresado mediante células renales, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (Uromodulina). En otras modalidades determinadas, el efector de internalización es un internalizador específico del músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-caderina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye); (vi) un efector de internalización preferentemente expresado mediante células hepáticas, opcionalmente ASGR1 o ASGR2; (vii) un efector de internalización preferentemente

expresado mediante células musculares, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en Leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye), y/o (viii) una proteína efectora de internalización seleccionada del grupo que consiste en ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, MSR1, ASGR1, ASGR2, o PRLR. En algunas modalidades, el dominio de entrega se une al efector de internalización CD63. En algunas modalidades, al menos uno del uno o más dominios de entrega comprende una proteína de unión a antígeno. En algunas modalidades, cada uno del uno o más dominios de entrega comprende una proteína de unión a antígeno. En algunas modalidades, el dominio de entrega es un fragmento variable de cadena simple (scFv). En algunas modalidades, al menos uno del uno o más dominios de entrega comprende un mediocuerpo. En algunas modalidades, el dominio de entrega que se une a hTfR es un scFv, en donde el mediocuerpo se une a CD63, en donde el dominio enzimático es GAA, y en donde GAA se conjuga al extremo carboxi del mediocuerpo que se une a CD63. En algunas modalidades, cada uno del uno o más dominios de entrega comprende un scFv. En algunas modalidades, al menos un scFv se fusiona a un Fc. En algunas modalidades, el Fc comprende un isotipo de IgG4 humana de tipo silvestre, o derivado de este. En algunas modalidades, GAA se conjuga al extremo carboxi del Fc. En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende un scFv anti-hTfR y un scFv anti-hCD63. En algunas modalidades, tanto el scFv anti-hTfR como el scFv anti-hCD63 están unidos, en sus extremos carboxi, a una

sola enzima GAA. En algunas modalidades, el dominio de entrega es un scFv anti-hTfR, y el dominio enzimático se une al extremo carboxi del dominio VL del scFv. En algunas modalidades, el multidominio comprende, además, un segundo dominio de entrega unido al extremo N del dominio VH del scFv anti-hTfR. En algunas modalidades, el segundo dominio de entrega es un scFV anti-hCD63. En algunas modalidades, el dominio enzimático comprende la secuencia de aminoácidos que se expone como SEQ ID NO:1

Se proporcionan, además, proteínas terapéuticas multidominio que comprenden al menos dos dominios de entrega y al menos un dominio enzimático, en donde cada uno de los dos dominios de entrega se selecciona independientemente del grupo que consiste en un anticuerpo, un mediocuerpo, y un scFv, y en donde al menos uno o más de los dominios de entrega se asocia al menos con un dominio enzimático, preferentemente en donde el uno o más dominios de entrega se unen covalentemente al menos a un dominio enzimático. En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende no más de dos dominios de entrega. En algunas modalidades, solo uno de los dominios de entrega se asocia con el al menos un dominio enzimático. En algunas modalidades, cada uno de los al menos dos dominios de entrega se unen covalentemente a un dominio enzimático. En algunas modalidades, cada uno de los al menos dos dominios de entrega se unen covalentemente al mismo dominio enzimático. En algunas modalidades, cada uno de los al menos dos dominios de entrega se unen covalentemente a un dominio enzimático diferente. En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende no más de dos dominios de entrega, en donde el primer y el segundo dominios de entrega comprenden cada uno un scFv. En algunas modalidades, el scFv se fusiona a un Fc. En algunas modalidades, el mediocuerpo se une covalentemente en su extremo carboxi a un primer dominio enzimático y/o en donde el scFv se une covalentemente en su extremo carboxi a un Fc, y opcionalmente, un segundo dominio enzimático. En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende no más de dos dominios de

entrega, en donde el primer y el segundo dominios de entrega comprenden cada uno un scFv.

En algunas modalidades, tanto el primer como el segundo scFv se unen covalentemente a un dominio enzimático. En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende desde el extremo N al extremo C: el primer scFv, el segundo scFv, y el dominio enzimático. En

5 algunas modalidades, al menos un dominio de entrega se une a una molécula de tráfico lisosómico y al menos un dominio de entrega se une a un efector de transcitosis. En algunas

modalidades, la molécula de tráfico lisosómico se selecciona del grupo que consiste en CD63, ITGA7, CD9, CD63, CD81, CD82, o CD151, y en donde el efector de transcitosis se selecciona

del grupo que consiste en un receptor de LDL, un receptor de IgA, un receptor de transferrina, un receptor de Fc neonatal, receptor de insulina, CD98, y Basigina. En algunas modalidades, la
10 proteína terapéutica multidominio comprende una estructura como se ilustra en la Figura 1C, la Figura 1D, la Figura 1E, o la Figura 1F.

En la presente descripción también se proporcionan polinucleótidos que codifican las proteínas terapéuticas multidominio descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, un

15 polinucleótido proporcionado en la presente descripción comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus. En algunas

modalidades, el polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de ácido nucleico de

virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en

20 inglés). En algunas modalidades, el polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de

ácido nucleico de virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV), y en donde la secuencia de ácido nucleico de AAV comprende una secuencia repetida de

extremo interna, y opcionalmente, un elemento regulatorio específico del tejido tal como un

25 promotor específico del hígado o un promotor específico neuronal. En algunas modalidades, el

polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de ácido nucleico de virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV) que comprende una secuencia repetida de extremo interna que comprende la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, o ambas, y

5 opcionalmente, un elemento regulatorio específico del tejido tal como un promotor específico del hígado o un promotor específico neuronal. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende además un elemento regulatorio específico del tejido que comprende la secuencia que se expone como SEQ ID NO:8 y/o SEQ ID NO:9.

En un aspecto, la invención proporciona un vector de terapia génica, tal como un vector de

10 AAV, que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica conjugada a o fusionada a una CSR-BP, p. ej., un polinucleótido como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el vector de terapia génica se selecciona del grupo que consiste en un vector viral, opcionalmente en donde el vector viral es un virus natural, un virus modificado genéticamente, o un virus quimérico, y un polinucleótido desnudo

15 que comprende un polinucleótido descrito en la presente descripción, un complejo de polinucleótido, opcionalmente en donde el complejo de polinucleótido es una nanopartícula lipídica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 20-25 y lípidos, y cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un retrovirus, adenovirus, virus del

20 herpes simple, poxvirus, vaccinia virus, lentivirus, o un virus adeno-asociado. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es AAV9, Anc80, una quimera AAV2/8 y/o un AAV pseudotipado a un tejido específico, p. ej., el tejido hepático o neuronal.

En una modalidad, una proteína terapéutica, nucleótido que codifica la misma, y/o vectores de terapia génica que comprenden el nucleótido que codifica la misma se usa para tratar un sujeto

25 que necesita terapia de reemplazo enzimático, p. ej., en un método para entregar una proteína

terapéutica al sistema nervioso central (CNS) de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de nucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio a través de un método de entrega dirigido al hígado suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica multidominio en el CNS, en donde la proteína

5 terapéutica multidominio comprende un dominio de entrega y un dominio enzimático. En algunas modalidades, el sujeto es un animal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En un aspecto, un vector de AAV que contiene un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de scFv-hidrolasa se administra a un sujeto humano o no humano. El polinucleótido se

10 integra posteriormente en un locus genómico en el hígado y se produce la proteína de fusión codificada. En otra modalidad, el polinucleótido se transcribe episomalmente en el hígado y se produce la proteína de fusión codificada. En una modalidad específica, la proteína de fusión es una proteína de fusión anti-CD63scFv-GAA o una proteína de fusión anti-ITGA7scFv-GAA, el sujeto humano o no humano carece de actividad de GAA endógena, y la actividad de GAA se

15 restaura eficazmente en el sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto (humano o no humano) con una deficiencia enzimática al administrar al paciente un vector de terapia génica que contiene un gen que codifica una proteína terapéutica conjugada a o fusionada a una CSR-BP.

20 En la presente descripción se describen métodos para entregar una proteína terapéutica al sistema nervioso central (CNS) de un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición de nucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio a través de un método de entrega dirigida al hígado suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica multidominio en el CNS, en donde la proteína

25 terapéutica multidominio comprende un dominio de entrega y un dominio enzimático. En

algunas modalidades, el dominio de entrega es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a un efector de internalización. En algunas modalidades, la proteína terapéutica es una enzima lisosómica. En algunas modalidades, la enzima lisosómica es GAA. En algunas modalidades, la composición de nucleótido se administra por

5 medio de un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector de AAV. En algunas modalidades, la composición de nucleótido se administra a una dosis de al menos 2×10^{12} genomas virales por kilogramo (vg/kg). En algunas modalidades, el efector de internalización se expresa en la superficie de las células seleccionadas del grupo que consiste en: células en el CNS, células epiteliales, y células que cruzan la barrera hematoencefálica. En

10 algunas modalidades, el dominio de entrega se une a un efector de internalización. En algunas modalidades, el efector de internalización (i) se selecciona del grupo que consiste en CD63, Integrina alfa-7 (ITGA7), MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), proteína

15 de mielina y linfocitos (MAL), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, y CD36; (ii) se expresa en varios tipos de tejido, p. ej., CD63, MHC-I, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, IGF2R, Integrina alfa-7 (ITGA7), LRP5, LRP6, LRP8, Kremen-2, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, proteína

20 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR, MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), receptores de toxina diftérica, HBEGF (factor de crecimiento tipo EGF que se une a heparina), receptores de glutatona, receptores de glutamato, receptores de leptina, y receptores de folato, opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en

25 enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIID,

MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, enfermedad de Pompe, deficiencia de lipasa ácida lisosómica, leucodistrofia metacromática, enfermedades de Niemann-Pick de los tipos A, B, y C2, alfa-manosidosis, deficiencia de neuraminidasa, sialidosis, aspartilglicosaminuria, deficiencia combinada de saposina, enfermedad de Gaucher atípica, lipogranulomatosis de Farber, fucosidosis, y beta-manosidosis; (iii) preferentemente se expresa en los huesos y/o cartílagos, p. ej., colágeno X, Integrina alfa 10 (ITGA10), receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), isoforma C de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3C), proteína 1 de enlace a hialuronano y proteoglicano (CRT11), agregano, colágeno II, y Kremen-1, opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, beta-manosidosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, aspartilglicosaminuria, lipogranulomatosis de Farber, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, y alfa-manosidosis; (iv) preferentemente se expresa en monocitos, macrófagos, o microglia, p. ej., receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, CD36, MSR1 (receptor depurador 1 de macrófagos), MRC1 (receptor 1 de manosa de macrófagos), VSIG4 (proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y V-set), CD68 (macrosialina), y CSF1R (receptor de factor 1 de estimulación de colonia de macrófagos), opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de lipasa ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, y lipogranulomatosis de Farber; (v) preferentemente se expresa en células renales, p. ej., CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de familia 22 de portador de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina), opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas o se diagnostica con una enfermedad seleccionada del

grupo que consiste en enfermedad de Fabry, síndrome de Alport, enfermedad renal policística, y púrpura trombocitopénica trombótica; (vi) preferentemente se expresa en células hepáticas, p. ej., ASGR1 o ASGR2, opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas o se diagnostica con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de lipasa

5 ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, MPS VI, MPS VII, MPS II, enfermedades de Niemann-Pick de los tipos A, B, y C2, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, lipogranulomatosis de Farber; (vii) preferentemente se expresa en células musculares, p. ej., BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo),

10 LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor ACh delta), LRRC14B

15 (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye), opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas o se diagnostica con enfermedad de Pompe; (viii) se selecciona del grupo que consiste en ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, MSR1, ASGR1, ASGR2, o PRLR; y/o (ix) es CD63. En algunas modalidades, el dominio de entrega es un fragmento variable de cadena simple (scFv).

20 En algunas modalidades, la proteína de unión a receptores de la superficie celular (CSR) (CSR-BP) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una hidrolasa. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una glicosilasa. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una glucosidasa. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una alfa-glucosidasa.

25 En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:13, o un fragmento de esta. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende un anticuerpo anti-ABeta, o anti-Tau. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:11. En algunas modalidades, el dominio enzimático comprende una alfa-glucosidasa, y en donde los niveles de glucógeno en cualquier tejido del CNS en el sujeto se reducen durante al menos nueve meses después del tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto tiene enfermedad de Pompe. En algunas modalidades, la composición de nucleótido administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio de al menos 1 µg/ml. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una glucosidasa, tal como GAA (p. ej., SEQ ID NO:1) o GLA (p. ej., UniProtKB No. P06280, aa32-429, SEQ ID NO:13), y el paciente tiene enfermedad de Pompe o enfermedad de Fabry. En algunas modalidades, la CSR-BP es una proteína de unión a antígenos que se une a un receptor de internalización, tal como CD63 o ITGA7. En algunas modalidades, la CSR-BP es una molécula de scFv que se une a CD63. En algunas modalidades, la CSR-BP es una molécula de scFv que se une a ITGA7. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector de AAV que comprende un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica de fusión anti-CD63-GAA. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector de AAV que comprende un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica de fusión anti-ITGA7-GAA.

En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende un dominio de enzima GAA, y los altos niveles en suero de GAA se mantienen en el suero del paciente durante al menos 12 semanas después de administrar el vector de terapia génica. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una enzima GAA, y los niveles de glucógeno en el tejido del CNS en el paciente se reducen significativamente. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una enzima GAA, y los niveles de glucógeno se mantienen a niveles de tipo silvestre 3 meses, 6 meses, o 9 meses después de la administración del vector de terapia

génica. En algunas modalidades, la proteína terapéutica comprende una enzima GAA, y la fuerza muscular del paciente después del tratamiento se restaura a niveles de tipo silvestre. En un aspecto, la invención proporciona un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido, particularmente un tejido del CNS, en un sujeto humano o no humano mediante la

5 administración de un vector de terapia génica que contiene un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica fusionada a una CSR-BP. En algunas modalidades, el vector de terapia génica se administra a una dosis suficiente para proporcionar un nivel umbral de suero de la proteína terapéutica fusionado a una CSR-BP. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 1 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 2 µg/ml. En

10 algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 3 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 4 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 5 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 6 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 7 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 8 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 9 µg/ml. En

15 algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 10 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 11 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 12 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 13 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 14 µg/ml. En algunas modalidades, el nivel umbral es de al menos 15 µg/ml. En una modalidad, el tejido es cerebelo, médula espinal o

20 hipocampo. En una modalidad, el sujeto humano o no humano tiene enfermedad de Pompe. En una modalidad, la proteína terapéutica comprende una proteína de fusión de scFv-GAA anti-CD63. En otra modalidad, la proteína terapéutica comprende una proteína de fusión de scFv-GAA anti-ITGA7.

FIGURAS

25 La **Figura 1A** representa esquemáticamente las proteínas terapéuticas de multidominio. El

Panel A ilustra una proteína terapéutica multidominio que comprende un anticuerpo biespecífico (ii) y una enzima de reemplazo (i). El Panel B ilustra un polipéptido de fusión Fc de enzima (i) que se asocia con un mediocuerpo específico del efector de internalización (ii) para formar la proteína terapéutica multidominio. El Panel C ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo de efector anti-internalización. El Panel D ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo de efector anti-internalización. El Panel E ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo C de la cadena ligera de un anticuerpo de efector anti-internalización. El Panel F ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo de efector anti-internalización. El Panel G ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo C de un fragmento variable de cadena simple (scFv) que contiene una región VH (barra sombreada) y una región VL (barra abierta). El Panel H ilustra una enzima de reemplazo (hexágono) unida covalentemente a dos dominios de scFv, el primer scFv (i) que sirve como un primer dominio de entrega, y el segundo scFv (ii) que sirve como un segundo dominio de entrega. Las proteínas terapéuticas multidominio adicionales que no se ilustran en la Figura 1A incluyen, pero no se limitan a, proteínas terapéuticas multidominio que comprenden dos o más dominios de entrega y al menos un dominio enzimático. Como ejemplos no limitantes, los anticuerpos, los mediocuerpos y los dominios de scFv ilustrados en los paneles A-H de esta figura pueden representar cualquier tipo de dominio de entrega, y los dominios de entrega o enzimas de reemplazo adicionales también pueden asociarse para producir una proteína terapéutica multidominio. Los ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas multidominio que comprenden dos o más dominios de entrega se ilustran además en las Figuras 1C, 1D, y 1F, que incluyen una enzima de reemplazo (ilustrada como, pero sin

limitarse a, GAA) unida covalentemente a un primer mediocuerpo específico del efector de internalización, que se asocia con una segunda fusión Fc de scFv específica del efector de internalización, que también puede o no estar unido covalentemente a una enzima de reemplazo (ilustrada como, pero sin limitarse a, GAA), para formar la proteína terapéutica multidominio (las Figuras 1C y 1D), una enzima de reemplazo (ilustrada como, pero sin limitarse a, GAA) unida covalentemente al extremo C de cada uno de un mediocuerpo específico del efector antiinternalización, que sirve como un primer dominio de entrega, y una fusión Fc de scFv específica del efector de internalización, que sirve como un segundo dominio de entrega, donde tanto el mediocuerpo específico del efector antiinternalización y se asocian para formar la proteína terapéutica multidominio (Figura 1D), y una enzima de reemplazo unida covalentemente a un primer scFv, que se une, p. ej., a través de un enlazador, a un segundo scFv (Figura 1F).

La **Figura 1B** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de terapia génica de AAV que codifican cada una una proteína terapéutica multidominio representada en el panel G de la Figura 1A, en donde el scFv es un scFv anti CD63 humano y la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-hCD63scFv::hGAA; ver, p. ej., la secuencia de aminoácidos que se expone como SEQ ID NO:10). Los aminoácidos 1-117 de la SEQ ID NO:10 proporcionan la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) del anticuerpo H4H12450N; los aminoácidos 118-132 de la SEQ ID NO.:10 proporcionan una secuencia enlazadora de aminoácidos entre los dominios variables de cadena pesada y ligera de H4H12450N; los aminoácidos 133-240 de la SEQ ID NO.:364 proporcionan la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo H4H12450N; los aminoácidos 241-245 de la SEQ ID NO:10 proporcionan una secuencia enlazadora de aminoácidos entre el anti-hCD63scFv y GAA; y los aminoácidos 246-1128 de la SEQ ID NO:10 proporcionan la secuencia de aminoácidos de la enzima de reemplazo GAA, o una porción biológicamente activa de esta.

Las secuencias de 5'ITR y 3'ITR ilustrativas se exponen respectivamente como SEQ ID NO.:6 y SEQ ID NO.:7. El Panel A de esta Figura proporciona un vector ilustrativo de la expresión específica del hígado que comprende un potenciador específico del hígado ilustrativo (p. ej., pero sin limitarse a, *Serpina1*; que se expone como la SEQ ID NO.:9), un promotor específico del hígado ilustrativo (p. ej., pero sin limitarse a, *TTR*; que se expone como la SEQ ID NO.:8), un péptido de señal ilustrativo; una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio multiterapéutico anti-hCD63scFv::hGAA (SEQ ID NO.:10), y una cola poli-A. El Panel B de esta figura proporciona un vector ilustrativo similar al que se muestra en el Panel A con un promotor ubicuo ilustrativo en lugar de las secuencias de potenciador específico del hígado y el promotor específico del hígado. El Panel C de esta figura proporciona un vector ilustrativo similar al que se muestra en el Panel A con un promotor específico de las neuronas ilustrativo en lugar del potenciador específico del hígado (p. ej., *Serpina1*) y el promotor (p. ej., *TTR*). El Panel D de esta figura proporciona un vector ilustrativo similar al que se muestra en el Panel A con un promotor específico de las neuronas ilustrativo en combinación con un potenciador específico del hígado (p. ej., *Serpina1*) y un promotor (p. ej., *TTR*).

La **Figura 1C** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de expresión que codifican cada uno una proteína terapéutica multidominio como se ilustra, en donde el mediocuerpo es un anticuerpo anti-CD63, el scFv es un scFv de receptor anti transferrina humana, y en donde la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-hTfRscFv::hGAA).

La **Figura 1D** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de expresión que codifican cada uno una proteína terapéutica multidominio como se ilustra, en donde el mediocuerpo es un anticuerpo anti-CD63, en donde el scFv es un scFv de receptor anti transferrina humana (TfR) y el dominio Fc es un Fc de IgG4 humana, y en donde la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-hTfRscFv::hGAA).

La **Figura 1E** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de expresión que

codifican cada uno una proteína terapéutica multidominio representada en el Panel H de la Figura 1A, en donde uno de los dos scFv es un scFv anti CD63 humano, el otro de los dos scFv es un scFv de receptor anti transferrina humana (TfR), y la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-hCD63scFv::hGAA::anti-TfRscFV),

- 5 La **Figura 1F** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de expresión que codifican cada uno una proteína terapéutica multidominio tal como se ilustra, en donde uno de los dos scFv es un scFv anti CD63 humano, el otro de los dos scFv es un scFv de receptor anti transferrina humana (TfR), y la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-hCD63scFv::anti-TfRscFV::GAA o anti-TfRscFV::anti-hCD63scFv::GAA).
- 10 La **Figura 1G** proporciona ilustraciones ilustrativas no limitantes de vectores de expresión que codifican cada uno una proteína terapéutica multidominio como se ilustra en el panel G de la Figura 1A, en donde el scFv es un scFv de receptor anti transferrina humana (TfR) y la enzima de reemplazo es GAA (p. ej., anti-TfRscFV::GAA).

- La **Figura 2** es un gráfico de barras que ilustra la cantidad de glucógeno almacenado en
- 15 microgramos por miligramo de tejido como una función de la enzima entregada. El eje X ilustra los tejidos de un ratón CD63^{hu/hu}; GAA^{-/-} de izquierda a derecha: corazón, cuádriceps, gastrocnemio, diafragma, sóleo, y el músculo extensor largo de los dedos (EDL, por sus siglas en inglés). Las cajas del carril 1 ilustran la cantidad de glucógeno almacenado en un modelo de enfermedad de Pompe de ratón no tratado. Las cajas del carril 6 ilustran la cantidad de
- 20 glucógeno almacenado en un modelo de ratón de tipo silvestre no tratado. Las cajas del carril 2 ilustran la cantidad de glucógeno almacenado en un modelo de enfermedad de Pompe de ratón tratado con AAV-hGAA (vector de virus adeno-asociado que contiene un gen que codifica GAA humana) a una dosis de 10¹⁰ vg. Las cajas del carril 3 ilustran la cantidad de glucógeno almacenado en un modelo de enfermedad de Pompe de ratón tratado con AAV-hGAA a una
- 25 dosis de 10¹¹ vg. Las cajas del carril 4 ilustran la cantidad de glucógeno almacenado en un

modelo de enfermedad de Pompe de ratón tratado con AAV-anti-hCD63scFv::hGAA (vector de virus adeno-asociado que contiene un gen que codifica un dominio de scFv anti CD63 humano unido a GAA humana) a una dosis de 10^{10} vg. Las cajas del carril 5 ilustran la cantidad de glucógeno almacenado en un modelo de enfermedad de Pompe de ratón tratado con AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 3** es un gráfico que ilustra el glucógeno promedio medido ($\mu\text{g}/\text{mg}$) en el tejido muscular esquelético en cada ratón a los 3 meses después de la inyección de AAV. Cada medición se grafica como una función de la exposición a GAA (es decir, niveles en suero) por ratón tratado con una construcción enzimática particular en una dosificación particular. Los cuadrados rellenos representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Las pirámides rellenas representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{11} vg. Las pirámides invertidas rellenas representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los diamantes rellenos representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 4** es un gráfico de puntos que ilustra el glucógeno muscular cardíaco promedio medido ($\mu\text{g}/\text{mg}$) en el tejido cardíaco a los 3 meses después de la inyección de AAV como una función de la exposición a GAA (es decir, niveles en suero), por ratón tratado con una construcción enzimática particular en una dosis particular. Los cuadrados rellenos representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Las pirámides rellenas representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{11} vg. Las pirámides invertidas rellenas representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los diamantes rellenos representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 5** es un gráfico de puntos que ilustra los títulos de anticuerpo anti-GAA a los 3 meses después de la inyección de AAV como una función de la exposición a GAA (es decir, niveles en suero), por ratón tratado con una construcción enzimática particular en una dosis particular. Los cuadrados abiertos representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los círculos abiertos

representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{11} vg. Los diamantes abiertos representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los hexágonos representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 6** es un gráfico de puntos que ilustra los títulos de anticuerpo anti-GAA a los 3 meses después de la inyección de AAV como una función de la construcción enzimática y la dosis. Los círculos representan los ratones de control que reciben un vector de AAV vacío. Los cuadrados representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Las pirámides representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{11} vg. Las pirámides invertidas representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los diamantes representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 7A** es un gráfico de líneas que ilustra los niveles en suero de GAA (unidades arbitrarias “a.u.”; eje y) como una función del tiempo en semanas después de la inyección del vector de terapia génica. Los cuadrados (línea inferior) representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Las pirámides (segundas desde la línea superior) representan AAV-hGAA a una dosis de 10^{11} vg. Las pirámides invertidas (terceras desde la línea superior) representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{10} vg. Los diamantes (línea superior) representan AAV-anti-hCD63scFv::hGAA a una dosis de 10^{11} vg.

La **Figura 7B** es un gráfico de barras que ilustra las relaciones de ARNm (ARNm hGAA en relación con ARNm mGADPH) después de la administración de construcciones de AAV en ratones CD63 HumIn GAA KO (ratones GAA^{-/-}, CD63^{hu/hu}) o ratones GAA^{+/+}, CD63^{hu/hu}, como tal: (1) control no tratado, (2) hGAA promotor específico del hígado de AAV (1×10^{10} vg), (3) hGAA promotor específico del hígado de AAV (1×10^{11} vg), (4) anti-hCD63::hGAA promotor específico del hígado de AAV (1×10^{10} vg), (5) anti-hCD63::hGAA promotor específico del hígado de AAV (1×10^{11} vg), o (6) control no tratado (GAA^{+/+}, CD63^{hu/hu}). Se detectó la expresión hepática de GAA de todas las inyecciones de construcción de AAV.

La **Figura 7C** es un gráfico que compara el nivel en suero de GAA con el nivel de expresión de

ARN de GAA de los ratones que reciben el AAV que codifica la proteína de fusión (cuadrados) y los ratones que reciben el AAV que codifica GAA (ambas construcciones proporcionaron un promotor específico del hígado (LSP, por sus siglas en inglés) para impulsar la expresión).

La **Figura 7D** es un gráfico de barras que muestra hepatocitos humanos Huh-7 transfectados

5 transitoriamente con construcciones impulsadas por el promotor específico del hígado que codifican hGAA, scFv::GAA anti-hCD63 (construcción de fusión), o un control de scFv::GAA de construcción de fusión sin unión. Ambas construcciones de fusión scFv::GAA tuvieron una relación superior de proteína en el sobrenadante secretado que la hGAA sola 3 días después de la transfección. La adición de M6P en el sobrenadante durante el período experimental para
10 mitigar la absorción mediada por CI-MPR no afectó la relación (* = $p < 0.05$, $n=3$).

La **Figura 7E** es un gráfico de barras que ilustra la cantidad de título de suero de GAA como una función del vector entregado. El eje X ilustra el suero de ratones KO humanizado para CD63 (GAA^{-/-};CD63hu/hu) a los que se les proporcionó plásmidos que codifican GAA o fusión de ScFv-GAA de izquierda a derecha: 1) Control (sin tratamiento); 2) tratamiento con AAV-LSP-
15 hGAA (1e10vg/ratón); 3) tratamiento con AAV-LSP-hGAA (1e11vg/ratón); 4) tratamiento con AAV-LSP-anti-CD63:: hGAA (1e10vg/ratón); y 5) tratamiento con AAV-LSP-anti-CD63:: hGAA (1e11vg/ratón).

La **Figura 8** son micrografías fluorescentes que ilustran los lisosomas teñidos con lamp1 en fibras musculares de ratón contrateñidas con DAPI para revelar los núcleos. Los paneles A y A1

20 ilustran células de cuádriceps derivadas de un ratón de tipo silvestre (GAA^{+/+}) no tratado y teñido con lamp1 (panel A), y núcleos (panel A1). Los paneles B y B1 ilustran células de cuádriceps derivadas de un ratón con GAA nulo (GAA^{-/-}) no tratado y teñido con lamp1 (panel B), y núcleos (panel B1). Los paneles C y C1 ilustran células de cuádriceps derivadas de un ratón GAA^{-/-} tratado con una construcción de AAV-hGAA y teñido con lamp1 (panel C), y
25 núcleos (panel C1). Los paneles D y D1 ilustran células de cuádriceps derivadas de un ratón

GAA^{-/-} tratado con una construcción de AAV-hCD63scFv::hGAA y teñido con lamp1 (panel D), y núcleos (panel D1).

La **Figura 9** ilustra gráficos de líneas que muestran la fuerza de agarre y el rendimiento de la prueba de Rotarod de ratones tratados con AAV-LSP hGAA o AAV-LSP anti-hCD63::hGAA. Las mediciones de Rotarod de aceleración (**A**) y las mediciones de la fuerza de agarre de la extremidad anterior (**B**) de ratones GAA de tipo silvestre (triángulo invertido), control no tratado (cuadrado), tratamiento con AAV-LSP-hGAA (1e11vg/ratón) (triángulo) o tratamiento con AAV-LSP-anti-hCD63::hGAA (1e11vg/ratón) (círculo) se tomaron en intervalos mensuales durante 6 meses. Las barras de error son +/- desviación estándar. N=8-10 para todos los grupos.

La **Figura 10A** y la **Figura 10B** ilustran el uso de otras proteínas de membrana como guías, tales como las proteínas de fusión scFv anti-ITGA7 (Integrina alfa-7) para guiar GAA. La **Figura 10A** muestra la actividad de GAA (eje y) de mioblastos de ratón C2C12 incubados durante la noche con anti CD63-GAA de ratón o anti ITGA7-GAA de ratón con o sin la presencia de 5 mM de M6P. La **Figura 10B** muestra ratones GAA KO humanizados para CD63 (GAA^{-/-};CD63hu/hu) a los que se les proporcionó plásmidos que codifican un formato de scFv::GAA de anti-hCD63::GAA (2) o un formato de IgG4::GAA de longitud completa de anti integrina alfa-7 de ratón (3) mediante administración hidrodinámica (HDD, por sus siglas en inglés), después se midieron los niveles de glucógeno en tejido 3 semanas después de la HDD. También se probaron los niveles de glucógeno en los mismos tejidos de los ratones de control no tratados, GAA^{-/-};CD63hu/hu (1) y los ratones de control de GAA de tipo silvestre sin tratar, GAA^{+/+};CD63hu/hu (4).

La **Figura 11** ilustra la depuración de suero de un anticuerpo anti-CD63 de longitud completa fusionado a GAA (es decir, anticuerpo de IgG4 de longitud completa) en ratones CD63hu/hu en comparación con ratones WT CD63^{+/+}. Los plásmidos que expresan la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD63 fusionado a GAA se inyectaron por medio de la vena de la cola de

cada ratón. Se observó que el suero Pk de anti-CD63(IgG4 de longitud completa)::GAA se depuró del suero dentro de 24 horas.

La **Figura 12A** es un gráfico de puntos que ilustra los niveles en suero de GAA (unidades arbitrarias “a.u.”; eje y) un mes después de la inyección de AAV como función de la

5 construcción enzimática y la dosis. Los cuadrados representan AAV-LSP- Δ 8GAA. Las pirámides representan AAV-anti-hCD63scFv::GAA. Ambas construcciones proporcionaron un promotor específico del hígado (LSP) para impulsar la expresión). La dosis se proporciona como genoma viral (vg, por sus siglas en inglés) por kilogramo (kg) del ratón.

10 La **Figura 12B** proporciona resultados de dot blot que ilustran los niveles de glucógeno en microgramos por miligramo de tejido (corazón, cuádriceps, diafragma, o tríceps) como una función de los niveles en suero de GAA. Los cuadrados representan AAV-LSP- Δ 8GAA. Las pirámides representan AAV-anti-hCD63scFv::GAA. Ambas construcciones proporcionaron un promotor específico del hígado (LSP) para impulsar la expresión).

15 La **Figura 13** es un gráfico de barras que ilustra la cantidad de glucógeno almacenado en microgramos por miligramo de tejido del CNS como una función de enzima/vector entregados (estudio de 9 meses). El eje X ilustra cada tejido del CNS (médula espinal, cerebelo o hipocampo) muestreado a partir de comparadores de ratones de tipo silvestre (cada Carril 4) o ratones KO (GAA^{-/-}) que estaban sin tratar (cada Carril 1), o plásmidos determinados que codifican GAA (cada Carril 2) o fusión de ScFv-GAA (cada Carril 3). Se produjo un hallazgo
20 inesperado de que los ratones tratados con proteína de fusión exhibieron una disminución más robusta de las reservas de glucógeno en el tejido del CNS en comparación con la entrega de vector que codifica GAA sin ningún dominio de unión fusionado.

La **Figura 14A** es un gráfico que ilustra la cantidad de glucógeno almacenado por mg de tejido de médula espinal (ug de glucógeno/mg de tejido; eje y) 3 meses después de la entrega de
25 AAV de GAA en una construcción de vector específico en una dosis específica (vg= genomas

virales). Se proporcionan los niveles de glucógeno de ratones de tipo silvestre (Carril 1; eje x) en comparación con ratones KO (GAA^{-/-}) que estaban sin tratar (Carril 2; eje x), o plásmidos determinados que codifican GAA (cada Carril 3; eje x) o dosis variables de fusión de anti-CD63ScFv-GAA (Carriles 4-6; eje x). Los niveles de glucógeno almacenado en la médula espinal disminuyeron con el aumento de la dosis de fusión ScFv-GAA, con la dosis de 1e11vg proporcionando un mayor beneficio al sujeto que una dosis equivalente de GAA sola (sin fusión).

La **Figura 14B** es un gráfico que ilustra la cantidad de glucógeno almacenado por mg de tejido cerebral (ug de glucógeno/mg de tejido; eje y) 3 meses después de la entrega de AAV de GAA en una construcción de vector específica en una dosis específica (vg= genomas virales). Se proporcionan los niveles de glucógeno de ratones de tipo silvestre (Carril 1; eje x) en comparación con ratones KO (GAA^{-/-}) que estaban sin tratar (Carril 2; eje x), o plásmidos determinados que codifican GAA (cada Carril 3; eje x) o dosis variables de fusión de anti-CD63ScFv-GAA (Carriles 4-6; eje x). Los niveles de glucógeno almacenado en el cerebro disminuyeron con el aumento de la dosis de fusión ScFv-GAA, con la dosis de 1e11vg proporcionando un mayor beneficio al sujeto que una dosis equivalente de GAA sola (sin fusión).

DESCRIPCIÓN

La presente invención no se limita a modalidades, composiciones, métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales modalidades, composiciones, métodos y condiciones pueden variar. La terminología que se usa en la presente descripción es solamente a efectos de describir únicamente modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención solo será limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la

presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora algunos métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente descripción se incorporan en la presente descripción como referencia para describir en su totalidad. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

“Barrera hematoencefálica” se refiere a la barrera de membrana semipermeable que separa la sangre del cerebro y el fluido extracelular en el sistema nervioso central. La barrera bloquea el paso de, o transporta selectivamente, determinadas sustancias al cerebro y la médula espinal. La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales cerebrales.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad o dosificación del vector administrado a un sujeto de tal manera que el sujeto logre un nivel sanguíneo constante (nivel en suero/plasma) de la proteína terapéutica codificada. Generalmente, las concentraciones de aproximadamente 1×10^9 a alrededor de 1×10^{16} vector de genomas pueden utilizarse en el método. La dosificación para la entrega al hígado puede ser de aproximadamente 1×10^{10} a 5×10^{13} genomas de AAV por 1 kg. La dosificación se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico de cruzar la barrera hematoencefálica para lograr el efecto deseado de la molécula contra cualquier efecto secundario y tales dosificaciones pueden variar dependiendo del vector recombinante que se emplea. Los niveles de expresión del transgén pueden monitorearse en la circulación sanguínea mediante extracción de suero o plasma para determinar la frecuencia de dosificación de los vectores que lograrán un estado estacionario de la proteína circulante. Un experto en la técnica puede determinar valores específicos de una cantidad eficaz, por ejemplo, realizando experimentos para determinar niveles sanguíneos consistentes de proteína terapéutica durante días, semanas o meses consecutivos después de la entrega del vector. Los

experimentos adecuados para probar la proteína terapéutica circulante se conocen en la técnica, que incluyen pero no se limitan a western blot, ELISA, LC-MS, etc. En un ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de fusión de scFv-GAA en el CNS es una cantidad de vector viral que produce cantidades suficientes de proteína de fusión de scFv-GAA para reducir el glucógeno almacenado en el tejido del CNS, por ejemplo, en el tejido de la médula espinal, el cerebelo o el hipocampo.

Trastornos del CNS

Varios trastornos cerebrales pueden beneficiarse del modo de entrega de proteínas terapéuticas descritas en la presente descripción. Los trastornos del CNS y los trastornos con síntomas neurológicos susceptibles a terapias de proteínas incluyen, pero no se limitan a: Alzheimer, cáncer de cerebro, enfermedad de Behcet, lupus cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia, epilepsia, encefalitis, ataxia de Friedreich, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Gaucher, dolor de cabeza, hidrocefalia, enfermedad de Huntington, hipertensión intracraneal, leucodistrofia, migraña, miastenia grave, distrofia muscular, esclerosis múltiple, narcolepsia, neuropatía, síndrome de Prader-Willi, enfermedad de Parkinson, síndrome de Rett, síndrome de las piernas inquietas, trastornos del sueño, hemorragia subaracnoidea, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico, neuralgia del trigémino, accidente isquémico transitorio, y síndrome de Von Hippel-Lindau (angiomatosis).

La entrega de fusión de anti-CD63 de una proteína terapéutica al CNS puede ser particularmente beneficiosa debido a su expresión ubicua, su papel como una proteína de membrana de vesículas extracelulares (EV; p. ej., exosomas) y asociación con integrinas. Otros receptores de la superficie celular con propiedades similares a los efectores de internalización incluyen: ITGA7, CD9, CD63, CD81, CD82, y CD151, y pueden ser específicos del tejido o tipo de célula para mejorar la ubicación deseada de la absorción, como se describe en toda la descripción.

La entrega de fusión de antitransferrina de una proteína terapéutica al CNS también ha demostrado ser particularmente beneficiosa. El tráfico y la entrega de proteínas terapéuticas, por lo tanto, mejorarán mediante el uso de mecanismos de entrega, tales como fusión antirreceptor a dianas de barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) particulares.

- 5 Algunas dianas de BBB se han mostrado como beneficiosas para la absorción del CNS (Zuchero, et al., 6 de enero de 2016, Neuron, 89(1): 70-82; Boado, RJ et al, Mol Pharm. 4 de agosto de 2014; 11(8): 2928–2934; cada uno de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Otros receptores de la superficie celular con propiedades de absorción de BBB similares a los receptores de transferrina incluyen, pero no se limitan a: receptor de insulina, CD98, y Basigina (Bsg).

En algunas modalidades, la entrega dirigida de la proteína terapéutica al tejido del CNS (p. ej., cerebro) se emplea mediante el uso del receptor de antitransferrina o receptor de antiinsulina, o anti-CD98 o anti-Bsg. La proteína terapéutica también puede fusionarse a un anticuerpo de efector de internalización, como se describe en la presente descripción en toda la descripción.

- 15 En algunas modalidades, la entrega dirigida de la proteína terapéutica al CNS y a los tejidos periféricos se emplea mediante el uso de un dominio de entrega de receptor de antiinsulina, por ejemplo para mejorar tanto la absorción del cerebro así como la absorción periférica (Boado, RJ et al, 2014, supra; Yu et al., 25 de mayo de 2011, Science Transl Med. 3:84ra44, cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

- 20 Los anticuerpos de receptor de antitransferrina, receptor de antiinsulina, anti-CD98, y anti-Bsg ilustrativos y porciones de estos que pueden ser útiles como parte de una proteína terapéutica multidominio como se describe en la presente descripción son conocidos en la técnica (véase, p. ej., US20170174778; US20150196663; US9629801; US20180002433; WO2016081643; US20180134797; WO2014189973; US20150110791; US9708406; US20170260292;

- 25 WO2016081640; US20180057604; US9611323; WO2012075037; WO2018210898,

US20180344869, US20180282408, US20170051071, WO2016207240, WO2015101588, US20160324984; US20180222993; WO2017055542; US20180222992; WO2017055540; Cabezon, I., et al. Mol Pharm. 2 de noviembre de 2015;12(11):4137-45; Yu YJ, et al. Sci Transl Med (2014) 6:261ra154; Couch, et al. Sci Transl Med. 1 de mayo de 2013;5(183):183ra57, 1-12; y Yu et al., 2011, supra, por anticuerpos de receptor de antitransferrina ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., WO2017214456, WO2017214458, WO2017214462; WO2008017828; WO2015146132; WO2016094566; WO2013078377; WO2017026497; Hayes GM et al. Int. J. Cancer (2015) 137:710-20; y Bixby, et al. American Society Hematology 2015 Meeting, Abstract# 3809 por anticuerpos de anti-CD98 ilustrativos no limitantes; véase p. ej., WO2011112566; US20110223176; US20140079711; WO2010036460; US8618264; WO2005092381; WO2018165619; y WO2017186182 por anticuerpos de anti-BSG ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., US8974791; WO2013081706; US20160152719; US20160208006; US20170114152; Pardridge, WM et al. BioDrugs. abril de 2018;32(2):169-176; Boado RJ et al. Mol. Pharm. (2016) 13:3241-6; Cieniewicz AM, et al. Diabetes (2017) 66:206-217; Bexwada, P. et al. J Pharmacol Exp Ther. febrerod de 2016;356(2):466-73; y Bedinger, DH, et al. J Pharmacol Exp Ther. abril de 2015;353(1):35-43 por anticuerpos de receptor de antiinsulina ilustrativos no limitantes; cada una de las referencias se incorpora en su totalidad como referencia). Un experto en la técnica podría conectar fácilmente estos anticuerpos conocidos, o porciones de unión a antígenos de estos (p. ej., scFv derivado de estos) a una proteína terapéutica como se describe en la presente descripción para producir y usar una proteína terapéutica multidominio como se describe en la presente descripción.

Enfermedades de almacenamiento lisosómico

Las “enfermedades de deficiencia enzimática” incluyen enfermedad de almacenamiento no lisosómico tal como enfermedad de Krabbe (galactosilceramidasa), fenilcetonuria, galactosemia, enfermedad del jarabe de arce, trastornos mitocondriales, ataxia de Friedreich, síndrome de

Zellweger, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, acidemia metilmalónica, acidemia propiónica, y enfermedades de almacenamiento lisosómico. Las “enfermedades de almacenamiento lisosómico” incluyen cualquier trastorno que resulte de un defecto en la función del lisosoma. Actualmente, se han

5 identificado aproximadamente 50 trastornos de almacenamiento lisosómico, donde los más conocidos incluyen las enfermedades de Tay-Sachs, Gaucher y Niemann-Pick. Las patogénesis de las enfermedades se atribuyen a la acumulación de productos de degradación incompleta en el lisosoma, usualmente debido a la pérdida de la función de la proteína. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son causadas por la pérdida de función o variantes atenuantes en

10 las proteínas cuya función normal es degradar o coordinar la degradación de los contenidos lisosómicos. Las proteínas asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen enzimas, receptores y otras proteínas transmembranales (p. ej., NPC1), proteínas modificadoras postraduccionales (p. ej., sulfatasa), proteínas de transporte de la membrana, y cofactores no enzimáticos y otras proteínas solubles (p. ej., activador del gangliósido GM2). Por

15 lo tanto, las enfermedades de almacenamiento lisosómico abarcan más que aquellos trastornos causados por enzimas defectuosas *per se*, e incluyen cualquier trastorno causado por cualquier defecto molecular. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, el término “enzima” pretende abarcar esas otras proteínas asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosómico.

20 La naturaleza de la lesión molecular afecta la gravedad de la enfermedad en muchos casos, es decir, la pérdida completa de función tiende a asociarse con la aparición prenatal o neonatal, e incluye síntomas graves; la pérdida parcial de función se asocia con una enfermedad más leve (relativamente) y de aparición tardía. Generalmente, solo un pequeño porcentaje de actividad necesita restaurarse para tener que corregir defectos metabólicos en las células deficientes. La

25 Tabla 1 enumera algunas de las enfermedades de almacenamiento lisosómico más frecuentes

y sus proteínas de pérdida de función asociadas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico se describen generalmente en Desnick y Schuchman, 2012.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son una clase de enfermedades raras que afectan la degradación de una gran cantidad de sustratos en el lisosoma. Esos sustratos

5 incluyen esfingolípidos, mucopolisacáridos, glicoproteínas, glucógeno, y oligosacáridos, que pueden acumularse en las células de las personas con una enfermedad que conduce a la muerte celular. Los órganos afectados por enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen el sistema nervioso central (CNS), el sistema nervioso periférico (PNS, por sus siglas en inglés), los pulmones, el hígado, los huesos, músculos esqueléticos y cardíacos, y el sistema
10 reticuloendotelial.

Las opciones para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen terapia de reemplazo enzimático (TRE), terapia de reducción de sustratos, terapia mediada por chaperonas farmacológicas, terapia de trasplante de células madre hematopoyéticas, y terapia génica. Un ejemplo de terapia de reducción de sustratos incluye el uso de Miglustat o Eliglustat
15 para tratar Gaucher Tipo 1. Estos fármacos actúan bloqueando la actividad de la sintasa, lo que reduce la posterior producción de sustrato. La terapia con células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés), por ejemplo, se usa para mejorar y enlentecer el fenotipo negativo del sistema nervioso central en pacientes con algunas formas de MPS. Véase R.M. Boustany, "Lysosomal storage diseases--the horizon expands," 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98,
20 octubre de 2013; cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia. La Tabla 1 enumera algunas enfermedades de almacenamiento lisosómico y sus enzimas asociadas u otras proteínas.

Tabla 1: Enfermedades de almacenamiento lisosómico

Clase	Enfermedad	Enzima/Proteína implicada
Esfingolipidosis	Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A

Clase	Enfermedad	Enzima/Proteína implicada
	Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa
	Enfermedad de Gaucher tipo I	β -Glucosidasa
	Enfermedad de Gaucher tipos II y III	Activador de saposina-C
	Enfermedades de Niemann-Pick tipos A y B	Esfingomielinasa
	Gangliosidosis GM1	β -Galactosidasa
	Gangliosidosis GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidasa A y B
	Gangliosidosis GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidasa A
	Gangliosidosis GM2 (deficiencia del activador de GM2)	Proteína activadora de GM2
	Gangliosidosis GM3	Sintasa GM3
	Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
	Deficiencia del activador de esfingolípidos	Activador de esfingolípidos
Mucopolisacaridosis	MPS I (enfermedad de Scheie, Hurler-Scheie y Hurler)	α -Iduronidasa
	MPS II (Hunter)	Iduronidasa-2-sulfatasa
	MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparán N-sulfatasa
	MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-acetil- α -glucosaminidasa
	MPS IIIC (Sanfilippo C)	Acetil-CoA; α -glucosamida N-acetiltransferasa
	MPS IIID (Sanfilippo D)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa
	MPS IVA (síndrome de Morquio A)	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa

Clase	Enfermedad	Enzima/Proteína implicada
	MPS IVB (síndrome de Morquio B)	β -Galactosidasa
	MPS VI (Maroteaux-Lamy)	<i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)
	MPS VII (enfermedad de Sly)	β -Glucuronidasa
	MPS IX	Hilauronidasa
Enfermedad de almacenamiento de glucógeno	Pompe (enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II)	α -Glucosidasa 2
Metabolismo de lípidos	Deficiencia de la lipasa ácida lisosómica (LAL-D; enfermedad de Wolman)	Lipasa ácida lisosómica

Dos de las LSD más frecuentes son la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Pompe, que tiene una incidencia estimada de 1 en 10,000, es causada por la enzima lisosómica alfa-glucosidasa (GAA) defectuosa, lo que resulta en el procesamiento

5 deficiente del glucógeno lisosómico. La acumulación de glucógeno lisosómico se produce predominantemente en tejidos esqueléticos, cardíacos y hepáticos. La enfermedad de Pompe de aparición en la infancia causa cardiomegalia, hipotonía, hepatomegalia y muerte debido a la insuficiencia cardiorrespiratoria, usualmente antes de los 2 años de edad. La enfermedad de

10 Pompe de aparición en la adultez se produce tan tarde como la segunda a sexta décadas y usualmente solo implica a músculos esqueléticos. Los tratamientos actualmente disponibles incluyen MYOZYME®/LUMIZYME® de Genzyme (alglucosidasa alfa), que es una alfa-glucosidasa humana recombinante producida en células CHO y administrada por infusión intravenosa.

La enfermedad de Fabry, que tiene, incluyendo los casos de aparición tardía leve, una

incidencia estimada total de 1 en 3,000, es causada por la enzima lisosómica alfa-galactosidasa A (GLA) defectuosa, lo que resulta en la acumulación de globotriaosilceramida dentro de los vasos sanguíneos y otros tejidos y órganos. Los síntomas asociados con la enfermedad de Fabry incluyen dolor por daño nervioso y/o obstrucción vascular pequeña, insuficiencia y eventual fallo renal, complicaciones cardíacas tales como presión arterial alta y cardiomiopatía, síntomas dermatológicos tales como la formación de angioceratomas, anhidrosis o hiperhidrosis, y problemas oculares tales como córnea verticillata, cataratas tipo rayos, y anomalías vasculares conjuntivales y retinales. Los tratamientos disponibles actualmente incluyen FABRAZYME® de Genzyme (agalsidasa beta), que es una alfa-galactosidasa A humana recombinante producida en células CHO y administrada por infusión intravenosa; REPLAGAL™ de Shire (agalsidasa alfa), que es una alfa-galactosidasa A humana recombinante producida en células de fibroblastos humanas y que se administra por infusión intravenosa; y GALAFOLD™ de Amicus (migalastat o 1-desoxigalactonojirimicina) una chaperona de molécula pequeña administrada por vía oral que cambia el plegamiento de la alfa-galactosidasa A anormal a una conformación funcional.

Los tratamientos actuales para las enfermedades de almacenamiento lisosómico son menos óptimos. Por ejemplo, la TRE generalmente debe administrarse a una alta frecuencia y a una alta dosis, tal como dos veces por semana y hasta 40 mg/kg. Además, algunas enzimas reemplazadas pueden ser de reacción cruzada inmunológicamente (CRIM), lo que estimula la producción de IgG en el sujeto y por lo tanto dificulta la entrega de la enzima al lisosoma mediante el receptor de manosa-6-fosfato (M6P). Las IgG pueden proteger los residuos de M6P de la enzima de reemplazo, y el complejo antígeno-IgG-anticuerpo puede absorberse en lisosomas celulares a través del receptor de Fc, apartando de esta manera la enzima de reemplazo preferentemente a los macrófagos.

La entrega de enzimas de reemplazo a los tejidos afectados apropiados también es ineficiente

(véase la Tabla 2 y Desnick & Schuchman, “Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges,” 13 Annu. Rev.

Genomics Hum. Genet. 307-35, 2012), cuya referencia se incorpora en la presente descripción

en su totalidad como referencia. Por ejemplo, los pacientes que experimentan una terapia de

5 reemplazo enzimático a largo plazo para la enfermedad de Pompe infantil todavía pueden

padece de habla hipernasal, debilidad muscular residual, ptosis, osteopenia, pérdida de

audición, riesgo de aspiración, disfagia, arritmia cardíaca y dificultad para tragar. Las dosis de la

enzima de reemplazo a menudo deben aumentarse con el tiempo a 40 mg/kg semanalmente o

dos veces por semana.

10 **Tabla 2: Direccionamiento tisular ineficiente de TRE**

Enfermedad	Subtipo(s)	Tejido fácil de alcanzar	Tejido difícil de alcanzar
Enfermedad de Gaucher	Tipo 1	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso
	Tipos 2 y 3	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro
Enfermedad de Fabry	Aparición clásica y tardía	Endotelio vascular	Riñón, corazón
Mucopolisacaridosis	Todas	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro, cartílago
α -Manosidosis	---	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro
Enfermedad de Niemann-Pick	Tipo B	Bazo, hígado, médula ósea	Macrófagos alveolares

Enfermedad de Pompe	Infantil	---	Corazón, músculo liso y esquelético
	Aparición posterior	---	Músculo liso y músculo esquelético respiratorio

El receptor de manosa-6 fosfato (MPR) endógeno media el transporte de la mayoría de las enzimas recombinantes al lisosoma. Existen dos formas complementarias de MPR:

independiente de cationes (CI-MPR), y dependiente de cationes (CD-MPR). Las

- 5 desactivaciones de cualquier forma tienen enzimas lisosómicas no clasificadas. Las hidrolasas lisosómicas se sintetizan en el retículo endoplásmico y se mueven a la red de cis-Golgi, donde se modifican covalentemente mediante la adición de grupos de manosa-6-fosfato (M6P). La formación de este marcador depende del efecto secuencial de dos enzimas lisosómicas: UDP-*N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (G1cNac-fosfotransferasa) y *N*-acetilglucosamina-1-
- 10 fosfodiéster- α -*N*-acetil-glucosaminidasa (enzima de descubrimiento). La G1cNac-fosfotransferasa cataliza la transferencia de un residuo de G1cNac-1- fosfato de UDP-G1cNac a posiciones C6 de manosas seleccionadas en oligosacáridos de tipo alto de manosa de las hidrolasas. Después, la enzima de descubrimiento elimina el extremo G1cNac, que expone la señal de reconocimiento de M6P. En la red de trans-Golgi, la señal de M6P permite la
- 15 segregación de hidrolasas lisosómicas desde todos los otros tipos de proteínas a través de la unión selectiva a los receptores de M6P. Las vesículas recubiertas de clatrina produjeron brotes a partir de la red de trans-Golgi y se fusionan con endosomas tardíos. Al pH bajo del endosoma tardío, las hidrolasas se disocian de los receptores de M6P y los receptores vacíos se reciclan al aparato de Golgi para rondas de transporte adicionales.
- 20 Con la excepción de la β -glucocerebrosidasa, que se entrega a través del receptor de manosa, las enzimas lisosómicas recombinantes comprenden glicosilación de M6P y se entregan al

lisosoma principalmente mediante CI-MPR/IGF2R. Sin embargo, la entrega de reemplazo enzimático mediada por glicosilación/CI-MPR no alcanza todos los tejidos clínicamente relevantes (Tabla 2). Las mejoras a la terapia de reemplazo enzimático se han centrado en mejorar la entrega de CI-MPR (i) aumentando la expresión superficial de CI-MPR usando el β 2-agonista clenbuterol (Koeberl *et al.*, "Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle," 103(2) Mol. Genet. Metab. 107-12, 2011, cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia), (ii) aumentando la cantidad de residuos de M6P en las enzimas (Zhu *et al.*, "Conjugation of mannose-6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in Pompe mice," 279(48) J. Biol. Chem. 50336-41, 2004, cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia), o (iii) fusionando un dominio IGF-II a la enzima (Maga *et al.*, "Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice," 288(3) J. Biol. Chem. 1428-38, 2013, cuya referencia se incorpora a la presente descripción en su totalidad como referencia).

Una gran cantidad de enfermedades de almacenamiento lisosómico se tratan inadecuadamente mediante terapia de reemplazo enzimático o terapia génica principalmente debido a un mal direccionamiento de la enzima de reemplazo al tejido u órgano relevantes, reacciones inmunológicas negativas en el hospedador receptor, y baja vida media en suero. Existe una necesidad de mejores terapias de reemplazo enzimático que mejoren y promuevan una mejor biodistribución tisular y absorción lisosómica de la enzima, especialmente en el cerebro y la médula espinal sin inyecciones intratecales indeseables. Los solicitantes han desarrollado una mejor terapia de reemplazo enzimático mediante el uso de una entrega guiada por proteínas de unión independiente de CI-MPR de enzimas y expresión hepática para proporcionar enzimas al lisosoma de tejidos afectados objetivo, particularmente tejidos del CNS.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico pueden categorizarse de acuerdo con el tipo de producto que se acumula dentro del lisosoma defectuoso. Las esfingolipidosis son una clase de enfermedades que afectan el metabolismo de los esfingolípidos, que son lípidos que contienen ácidos grasos unidos a aminoalcoholes alifáticos (lo cual se explica en S. Hakomori, “Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis,” 50 Annual Review of Biochemistry 733-764, julio de 1981; cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Los productos acumulados de esfingolipidosis incluyen gangliósidos (p. ej., enfermedad de Tay-Sachs), glicolípidos (p. ej., enfermedad de Fabry), y glucocerebrósidos (p. ej., enfermedad de Gaucher).

Las mucopolisacaridosis son un grupo de enfermedades que afectan el metabolismo de los glicosaminoglicanos (GAGS o mucopolisacáridos), que son cadenas largas no ramificadas de disacáridos repetitivos que ayudan a construir huesos, cartílagos, tendones, corneas, piel y tejido conectivo (lo cual se explica en J. Muenzer, “Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses,” 111(2) Mol. Genet. Metab. 63-72 (febrero de 2014);

Sasisekharan *et al.*, “Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans,” 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (diciembre de 2014); cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Los productos acumulados de mucopolisacaridosis incluyen sulfato de heparán, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, varias formas de sulfato de condroitina, y ácido hialurónico. Por ejemplo, el síndrome de Morquio A se debe a un defecto en la enzima lisosómica galactosa-6-sulfato sulfatasa, que resulta en la acumulación lisosómica de sulfato de queratina y condroitina 6-sulfato.

Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno (también conocidas como glicogenosis) resultan de la incapacidad de una célula de metabolizar (producir o degradar) glucógeno. El metabolismo de glucógeno es moderado por varias enzimas u otras proteínas que incluyen

glucosa-6-fosfatasa, alfa-glucosidasa ácida, enzima de desramificación de glucógeno, enzima de ramificación de glucógeno, fosforilasa de glucógeno muscular, fosforilasa de glucógeno hepático, fosfofructoquinasa muscular, fosforilasa quinasa, transportador de glucosa, aldolasa A, beta-enolasa, y glucógeno sintasa. Una enfermedad de almacenamiento

- 5 lisosómico/almacenamiento de glucógeno ilustrativa es la enfermedad de Pompe, donde la alfa-glucosidasa ácida defectuosa causa que se acumule glucógeno en los lisosomas. Los síntomas incluyen hepatomegalia, debilidad muscular, insuficiencia cardíaca, y en el caso de la variante infantil, muerte a los 2 años de edad (véase DiMauro y Spiegel, "Progress and problems in muscle glycogenosis," 30(2) Acta Myol. 96-102 (octubre de 2011); cuya referencia se incorpora
- 10 en la presente descripción en su totalidad como referencia).

"Proteína terapéutica multidominio" incluye (i) una sola proteína que contiene más de un dominio funcional, (ii) una proteína que contiene más de una cadena polipeptídica, y (iii) una mezcla de más de una proteína o más de un polipéptido. Se entiende que el término polipéptido generalmente significa una cadena simple de aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces

15 peptídicos. El término proteína abarca el término polipéptido, pero también incluye estructuras más complejas. Es decir, un solo polipéptido es una proteína, y una proteína puede contener uno o más polipéptidos asociados en una estructura de orden superior. Por ejemplo, la hemoglobina es una proteína que contiene cuatro polipéptidos: dos polipéptidos de alfa globina y dos polipéptidos de beta globina. La mioglobina también es una proteína, pero contiene solo

20 un único polipéptido de mioglobina.

La proteína terapéutica multidominio comprende uno o más polipéptidos y al menos dos dominios que proporcionan dos funciones. Uno de esos dominios es el "dominio enzimático" que proporciona el reemplazo de una actividad de proteína defectuosa asociada con una enfermedad de deficiencia enzimática. El otro de esos dominios es el "dominio de entrega" que

25 proporciona unión a un efector de internalización. Por lo tanto, un único polipéptido que

proporciona una actividad de reemplazo enzimático y la capacidad de unirse a un efector de internalización (también conocida como proteína de unión al efector de internalización (actividad de dominio de entrega) es una proteína terapéutica multidominio. Además, una mezcla de proteínas, en donde una proteína proporciona la función enzimática, y otra proteína proporciona la actividad de unión al efector de internalización, es una proteína terapéutica multidominio. La Figura 1A ilustra varios ejemplos de proteínas terapéuticas multidominio. En un ejemplo (Figura 1A, panel A), la proteína terapéutica multidominio contiene una enzima (representada por el hexágono) y un anticuerpo biespecífico (la IE-BP) que se une a la enzima (líneas discontinuas) y un efector de internalización (líneas sólidas). Aquí, un grupo del anticuerpo biespecífico se une de manera no covalente a la enzima, y el otro grupo se une de manera no covalente al efector de internalización, lo que permite de esta manera la internalización de la enzima de reemplazo en la célula o compartimiento subcelular. En otro ejemplo (panel B), la proteína terapéutica multidominio comprende una sola proteína que contiene dos polipéptidos, un polipéptido que tiene función enzimática y el otro que tiene una función de dominio de entrega. Aquí, la enzima se fusiona a un dominio de Fc de inmunoglobulina o a una región constante de cadena pesada, que se asocia con el dominio de Fc del medio anticuerpo enzimático para formar la proteína terapéutica multidominio bifuncional. La modalidad ilustrada en el panel B es similar a la del panel A, excepto que la enzima se une covalentemente a uno de los medios anticuerpos, en lugar de a través de la interacción antígeno-anticuerpo en el dominio variable de inmunoglobulina del medio anticuerpo.

En otros ejemplos, la proteína terapéutica multidominio consiste en la enzima unida covalentemente (directa o indirectamente a través de un enlazador) al dominio de entrega. En una modalidad, la enzima se une al extremo C de una molécula de inmunoglobulina (p. ej., la cadena pesada o alternativamente la cadena ligera). En otra modalidad, la enzima se une al extremo N de la molécula de inmunoglobulina (p. ej., la cadena pesada o alternativamente la

cadena ligera). En estos ejemplos, la molécula de inmunoglobulina es el dominio de entrega.

Aún en otra modalidad, la enzima se une al extremo C de una molécula de scFv que se une al efector de internalización.

En una modalidad, la proteína terapéutica multidominio comprende al menos dos, y en algunas

5 modalidades no más de dos, dominios de entrega, cada uno de los cuales se dirige hacia un epítipo distinto, ya sea en el mismo antígeno o en dos antígenos diferentes. En una modalidad, el primer dominio de entrega se une a una molécula de tráfico lisosómico u otro efector de internalización (p. ej., CD63) u otro receptor de superficie celular similar, tal como ITGA7, CD9, CD63, CD81, CD82, o CD151. En otra modalidad, el segundo dominio de entrega se une a un

10 efector de transcitosis para facilitar el transporte transcelular de la proteína terapéutica multidominio. En una modalidad, el efector de transcitosis es, entre otras cosas, un receptor de LDL, un receptor de IgA, un receptor de transferrina, o un receptor de Fc neonatal (FcRn). En una modalidad específica, el dominio de entrega de transcitosis comprende una molécula que se une a un receptor de transferrina, tal como p. ej., un anticuerpo de receptor de

15 antitransferrina o una molécula de scFv de receptor de antitransferrina. Tuma y Hubbard, "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," *Physiological Reviews*, 83(3): 871-935 (1 de julio de 2003) se incorpora en la presente descripción como referencia para receptores de superficie celular que median la transcitosis que son útiles en la práctica de la presente invención. En una modalidad, un segundo dominio de entrega se une a un receptor de transferrina, u otra

20 proteína de superficie celular similar, tal como un receptor de insulina, CD98, o Basigina (Bsg). Cada proteína terapéutica multidominio que comprende al menos dos dominios de entrega también comprende al menos un dominio enzimático, p. ej., cada uno de los al menos dos dominios de entrega puede o no asociarse independientemente a un dominio enzimático en una manera descrita en la presente descripción (p. ej., a través de una interacción antígeno-

25 anticuerpo, a través de un enlace covalente directo, a través de un enlace covalente indirecto,

etc.), en donde al menos uno de los al menos dos dominios de entrega se asocia con el dominio enzimático. Adicionalmente, cada uno de los al menos dos dominios de entrega puede comprender independientemente un anticuerpo, un mediocuerpo, o un scFv (p. ej., un scFv fusionado con un Fc).

- 5 “Dominio enzimático” o “enzima” denota cualquier proteína asociada con la etiología o efecto fisiológico de una enfermedad de deficiencia enzimática. Una enzima incluye la enzima real, la proteína de transporte, el receptor, u otra proteína que es defectuosa y que se considera la lesión molecular que causó la enfermedad. Una enzima también incluye cualquier proteína que pueda proporcionar una actividad fisiológica o bioquímica similar o suficiente que reemplaza o
- 10 elude la lesión molecular de la enfermedad. Por ejemplo, una “isoenzima” puede usarse como una enzima. Los ejemplos de proteínas relacionadas con la enfermedad de almacenamiento lisosómico incluyen aquellas mencionadas en la Tabla 1 como “Enzima/Proteína implicada” y cualquier proteína conocida o descubierta posteriormente u otra molécula que eluda el defecto molecular de la enfermedad de deficiencia de la enzima.
- 15 En algunas modalidades, la enzima es una hidrolasa, que incluye esterasas, glicosilasas, hidrolasas que actúan sobre enlaces de éter, peptidasas, amidasas lineales, difosfatasa, hidrolasas de cetona, halogenasas, fosfoamidasa, sulfhidrolasas, sulfinasas, desulfinasas, y similares. En algunas modalidades, la enzima es una glicosilasa, que incluye glucosidasas y *N*-glicosilasas. En algunas modalidades, la enzima es una glucosidasa, que incluye alfa-amilasa,
- 20 beta-amilasa, glucano 1,4-alfa-glucosidasa, celulosa, endo-1,3(4)-beta-glucanasa, inulinasa, endo-1,4-beta-xilanasas, endo-1,4-b-xilanasas, dextranasas, quitinasas, poligalacturonidasas, lisozima, exo-alfa-sialidasas, alfa-glucosidasas, beta-glucosidasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, alfa-manosidasas, beta-manosidasas, beta-fructofuranosidasas, alfa,alfa-trehalosa, beta-glucuronidasas, xilan endo-1,3-beta-xilosidasas, amilo-alfa-1,6-glucosidasas,
- 25 hialuronoglucosaminidasas, hialuronoglucuronidasas, y similares.

En el caso de la enfermedad de Pompe, en la que el defecto molecular es un defecto en la actividad de α -glucosidasa, las enzimas incluyen alfa-glucosidasa humana, e “isoenzimas” tales como otras alfa-glucosidasas, alfa-glucosidasa recombinante modificada genéticamente, otras glucosidasas, glucosidasas recombinantes, cualquier proteína modificada genéticamente para hidrolizar un residuo de alfa-glucosa unido en 1-4 no reductor de extremo para liberar una sola molécula de alfa-glucosa, cualquier enzima EC 3.2.1.20, hidrolasas de carbohidrato de bajo pH recombinantes para glucógeno o almidones, y glucosil hidrolasas tales como sacarasa isomaltasa, maltasa glucoamilasa, glucosidasa II, y alfa-glucosidasa neutra.

Un “efector de internalización” incluye una proteína, en algunos casos una proteína receptora, que es capaz de internalizarse en una célula o que participa o contribuye de cualquier otra manera al tráfico de membrana retrógrado. El efector de internalización, el efector de internalización, el receptor de internalización, y el receptor de internalización se usan indistintamente en la presente descripción. En algunos casos, el efector de internalización es una proteína que experimenta transcitosis; es decir, la proteína se internaliza en un lado de una célula y se transporta al otro lado de la célula (p. ej., de apical a basal). En muchas modalidades, la proteína de efector de internalización es una proteína expresada en la superficie celular o una proteína extracelular soluble. Sin embargo, la presente invención también contempla modalidades en las que la proteína de efector de internalización se expresa dentro de un compartimiento intracelular tal como el endosoma, el retículo endoplasmático, Golgi, el lisosoma, etc. Por ejemplo, las proteínas implicadas en el tráfico de membrana retrógrado (p. ej., trayectorias de endosomas tempranos/de reciclaje a la red de trans-Golgi) pueden servir como proteínas de efector de internalización en varias modalidades de la presente invención. En cualquier caso, la unión del dominio de entrega a una proteína de efector de internalización causa que toda la proteína terapéutica multidominio, y cualquier molécula asociada con ella (p. ej., enzima), también se internalice en la célula. Como se explica

a continuación, las proteínas de efector de internalización incluyen proteínas que se internalizan directamente en una célula, así como proteínas que se internalizan indirectamente en una célula.

Las proteínas de efector de internalización que se internalizan directamente en una célula incluyen moléculas asociadas a la membrana con al menos un dominio extracelular (p. ej., proteínas transmembranales, proteínas ancladas con GPI, etc.), que experimentan internalización celular, y se procesan preferentemente mediante una trayectoria de reciclaje y/o degradativa intracelular. Los ejemplos no limitantes específicos de proteínas de efector de internalización que se internalizan directamente en una célula incluyen, p. ej., CD63, MHC-I (p. ej., HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), MAL (proteína de mielina y linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptores depuradores (p. ej., SCARA1-5, SCARB1-3, CD36), y similares.

En una modalidad, el efector de internalización se expresa en varios tipos de tejido y es útil en el tratamiento donde se desea el direccionamiento tanto del CNS como de un tipo de célula periférica. Los efectores de internalización útiles en el tráfico tanto a los tipos de células periféricas como al CNS incluyen, pero no se limitan a CD63, MHC-I, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, IGF2R, Integrina alfa-7 (ITGA7), LRP5, LRP6, LRP8, Kremen-2, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR, MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), receptores de toxina diftérica, HBEGF (factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina), receptores de glutatona, receptores de glutamato, receptores de leptina, y receptores de folato. En determinados modalidades, el efector de internalización es un receptor de prolactina (PRLR, por

sus siglas en inglés). Se descubrió que el PRLR es, no solo un objetivo para determinadas aplicaciones terapéuticas, sino también una proteína de efector de internalización eficaz con base en su alta tasa de internalización y renovación. El potencial del PRLR como una proteína de efector de internalización, por ejemplo, se ilustra en W02015/026907, donde se demuestra, entre otras cosas, que los anticuerpos anti-PRLR son internalizados eficazmente por las células que expresan PRLR in vitro.

El direccionamiento a los efectores de internalización expresados por varios tipos de células puede ser útil donde se desea el direccionamiento tanto al CNS como a un tipo de célula periférica, p. ej., para tratar enfermedades tales como la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIID, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, enfermedad de Pompe, deficiencia de lipasa ácida lisosómica, leucodistrofia metacromática, enfermedades de Niemann-Pick tipos A, B, y C2, Alfa mannosidosis, deficiencia de neuraminidasa, sialidosis, aspartilglucosaminuria, deficiencia combinada de saposina, enfermedad de Gaucher atípica, lipogranulomatosis de Farber, fucosidosis, y Beta mannosidosis.

En otra modalidad, el efector de internalización se expresa en unos pocos tipos de tejidos. En un ejemplo, el efector de internalización puede dirigirse preferentemente a huesos y cartílagos. Los efectores útiles para el tráfico al CNS, y a cualquiera o ambos de huesos y cartílagos incluyen, pero no se limitan a, colágeno X, integrina alfa 10 (ITGA10), receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), isoforma C de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3C), proteína 1 de enlace a hialuronano y proteoglicano (CRT11), agrecano, colágeno II, y Kremen-1. Tales efectores son útiles en un tratamiento donde se desea el direccionamiento tanto al CNS como al esqueleto y cartílagos.

El direccionamiento de los efectores de internalización expresados preferentemente en huesos y cartílagos puede ser útil cuando se desea el direccionamiento tanto al CNS como al esqueleto y cartílagos, p. ej., en el tratamiento de enfermedades tales como MPS I, MPS II, MPS IIIA,

MPS IIIB, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, Beta mannosidosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, aspartilglucosaminuria, lipogranulomatosis de Farber, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, mucopolisacaridosis, y Alfa mannosidosis.

- 5 Aún en otra modalidad, el efector de internalización se expresa preferentemente en un tejido o tipo de célula particular, tal como macrófagos, monocitos, y microglía. Los efectores útiles para el tráfico al CNS, y a los macrófagos incluyen, pero no se limitan a receptores depuradores A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, CD36, MSR1 (receptor depurador 1 de macrófagos), MRC1 (receptor 1 de manosa de macrófagos), VSIG4 (proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y
- 10 V-set), CD68 (Macrosialina), y CSF1R (receptor de factor 1 de estimulación de colonia de macrófagos). Tales efectores son útiles en un tratamiento donde se desea el direccionamiento tanto al CNS como a macrófagos. Los macrófagos del CNS pueden denominarse microglía. El direccionamiento de los efectores de internalización expresados preferentemente por los macrófagos (monocitos o microglía) puede ser útil cuando se desea el direccionamiento tanto al
- 15 CNS como a los macrófagos (o microglía), p. ej., en el tratamiento de enfermedades tales como deficiencia de lipasa ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, y lipogranulomatosis de Farber.
- En determinados modalidades, el efector de internalización es un efector de internalización específico del riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R
- 20 (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina).
- El direccionamiento de los efectores de internalización expresados preferentemente en el riñón puede ser útil cuando se desea el direccionamiento tanto al CNS como al riñón, p. ej., en el
- tratamiento de enfermedades tales como enfermedad de Fabry, síndrome de Alport,
- 25 enfermedad renal poliquística, y púrpura trombocitopénica trombótica.

Aún en otra modalidad, el efector de internalización se expresa preferentemente en un tejido o tipo de célula particular, tal como el hígado. Los efectores útiles en el tráfico al CNS, y al hígado incluyen, pero no se limitan a ASGR1 y ASGR2. Tales efectores son útiles en un tratamiento donde se desea el direccionamiento tanto al CNS como al hígado.

- 5 El direccionamiento de los efectores de internalización expresados preferentemente en el hígado puede ser útil cuando se desea el direccionamiento tanto al CNS como al hígado, p. ej., en el tratamiento de enfermedades tales como deficiencia de lipasa ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, MPS VI, MPS VII, MPS II, enfermedades de Niemann-Pick tipos A, B, y C2, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia
- 10 combinada de saposina, lipogranulomatosis de Farber.

En algunas modalidades, el efector de internalización es un internalizador específico del músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1

15 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye).

- 20 El direccionamiento de los efectores de internalización expresados preferentemente en músculos puede ser útil cuando se desea el direccionamiento tanto al CNS como al tejido muscular, p. ej., en el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Pompe.

En algunas modalidades, el efector de internalización es ITGA7, ITGA10, CD9, CD63, ALPL2, MSR1, ASGR1, ASGR2, o PRLR. Los anticuerpos para ITGA7, ITGA10, CD9, CD63, APLP2,

25 MSR1, ASGR1, ASGR2 o PRLR son conocidos en la técnica (véase, p. ej., R & D Systems

- “Integrin alpha 7: Products” por anticuerpos anti-IGTA7 ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., US8048991, US20120034625, US8563255, US20140099716, US20160319023, WO2018138322, y US10087253 por ejemplos ilustrativos no limitantes de anticuerpos anti-ITGA10; véase, p. ej., WO201102982; WO2014185908; US20160115229; WO2017134197;
- 5 US9738717; y de Goeij BE et al. Mol. Cancer Ther. (2016) Nov;15(11):2688-2697 por anticuerpos anti-CD63 ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., US543153A; US5441931A; US5677146A; y US5935854A por anticuerpos anti-APLP2 ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., el catálogo de productos de R&D Systems por MAB27081; el catálogo de productos de R&D Systems por AF2708; el catálogo de productos de AbCam ab1515707; Yu X, et al., J. Biol.
- 10 Chem., 2011;286(21):18795-806; y N Nishijima, et al., Front Immunol, 2017;8(0):379 por ejemplos ilustrativos no limitantes de anticuerpos anti-MSR1; véase, p. ej., WO2017058944 por ejemplos ilustrativos no limitantes de anticuerpos anti-ASGR1; véase, p. ej., Origene Antibodies por ASGR2 disponible en
- 15 www.origene.com/category/antibodies?q=ASGR2&sub_category=Primary+Antibodies&reactivities=Human por anticuerpos anti-ASGR2 ilustrativos no limitantes; véase, p. ej., US9649374; US9302015; US20130171147; US10106616; WO2015026907; US9777063; WO2011069795; US20130272968; US20140141003; WO2011069799; US20120315276; WO2012163932; US9241989; WO2012136519; WO2011069798; WO2019011719; US8883979; US20140065158; WO2015187596; US9353186; WO2018102304; US20130022606;
- 20 US9688764; US20130129739; US20160002342; US20150056222; US20150056221; US20170008965; US20150093393; WO2011069797; US20160251442; US20180094066; WO2014036076; US20180185504; US20140271659; WO2011069794; WO2014143909; US20160319029; US9545451; US9023357; US20150252116; WO2011069796 Kelly MP, et al., Mol. Cancer Ther. (2017) Jul;16(7):1299-1311; Otto C. et al. Endocrinology (2015) 156:4365-73
- 25 2017-01-20; y Andreev J et al., Mol. Cancer Ther. (2017) Apr;16(4):681-693 por anticuerpos

anti-PRLR ilustrativos no limitantes; cada uno de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Un experto en la técnica podría conectar fácilmente estos anticuerpos conocidos, o porciones de unión a antígenos de estos (p. ej., scFv derivado de estos) a una proteína terapéutica como se describe en la presente descripción para producir y usar una proteína terapéutica multidominio como se describe en la presente descripción.

En aquellas modalidades en las que el efector de internalización (IE) se internaliza directamente en una célula, el dominio de entrega puede ser, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo que se une específicamente al IE, o un ligando o porción de un ligando que interactúa específicamente con el IE. Por ejemplo, si el IE es Kremen-1 o Kremen-2, el dominio de entrega puede comprender o consistir en un ligando de Kremen (p. ej., DKK1) o una porción de unión a Kremen de este. Como otro ejemplo, si el IE es una molécula receptora tal como ASGR1, el dominio de entrega puede comprender o consistir en un ligando específico para el receptor (p. ej., asialoorosomucoide [ASOR] o Beta-Ga1NAc) o una porción de unión a receptores de este.

Las proteínas de efector de internalización que se internalizan indirectamente en una célula incluyen proteínas y polipéptidos que no se internalizan por sí solos sino que se internalizan en una célula después de unirse o asociarse de cualquier otra manera con una segunda proteína o polipéptido que se internaliza directamente en la célula. Las proteínas que se internalizan indirectamente en una célula incluyen, p. ej., ligandos solubles que son capaces de unirse a una molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización. Un ejemplo no limitante de un ligando soluble que se internaliza (indirectamente) en una célula a través de su interacción con una molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización es la transferrina. En modalidades en donde el IE es transferrina (u otra proteína internalizada indirectamente), la unión del dominio de entrega al IE, y la interacción del IE con el receptor de

transferrina (u otra molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización), causa que el dominio de entrega completo, y cualquier molécula asociada con este (p. ej., la enzima), se internalice en la célula concomitante con la internalización del IE y su pareja de unión.

- 5 En aquellas modalidades en las que el IE se internaliza indirectamente en una célula, el dominio de entrega puede ser, p. ej., un anticuerpo, un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo, o un scFv que se une específicamente al IE, o un receptor o porción de un receptor que interactúa específicamente con la proteína de efector soluble. Por ejemplo, si el IE es una citocina, el dominio de entrega puede comprender o consistir en el receptor de citocinas
- 10 correspondiente o porción de unión al ligando de este.

Un IE ilustrativo es CD63, que es un miembro de la superfamilia de tetraspanina de proteínas de la superficie celular que abarcan la membrana celular cuatro veces. El CD63 se expresa virtualmente en todos los tejidos y se cree que está involucrado en la formación y estabilización de complejos de señalización. El CD63 se localiza en la membrana celular, la membrana

15 lisosómica, y la membrana endosómica tardía. Se conoce que el CD63 se asocia con integrinas y puede estar involucrado en la transición epitelial-mesenquimal. Véase H. Maecker *et al.*, "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators," 11(6) FASEB J. 428-42, mayo de 1997; y M. Metzelaar *et al.*, "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells," 266 J. Biol. Chem. 3239-3245,

20 1991; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

Otro IE ilustrativo es la proteína 2 tipo precursora amiloidea beta (A4) ("APLP2"), un miembro expresado de manera ubicua de la familia APP (proteína precursora amiloidea). La APLP2 es una proteína unida a la membrana conocida por interactuar con moléculas de clase I de

25 complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (p. ej., Kd). Se une a Kd en la superficie celular

y se internaliza en una manera dependiente de clatrina acompañado de Kd. Véase Tuli *et al.*, “Mechanism for amyloid precursor-like protein 2 enhancement of major histocompatibility complex class I molecule degradation,” 284 *The Journal of Biological Chemistry* 34296 -34307 (2009); cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

5 Otro IE ilustrativo es el receptor de prolactina (PRLR). El receptor de prolactina es un miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I y después de la unión al ligando y la dimerización posterior activa “las tirosina quinasas Jak2, Fyn and Tec, la fosfatasa SHP-2, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Vav, y el supresor de señalización SOCS,” (véase Clevenger y Kline, “Prolactin receptor signal transduction,” 10(10) *Lupus* 706-18 (2001),
 10 resumen; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). El receptor de prolactina experimenta reciclaje endocitótico y puede encontrarse en las fracciones lisosómicas. Véase Genty *et al.*, “Endocytosis and degradation of prolactin and its receptor in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor cDNA,” 99(2) *Mol. Cell Endocrinol.* 221-8 (1994); y Ferland *et al.*, “The effect of
 15 chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver,” 115(5) *Endocrinology* 1842-9 (1984), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

Como se usa en la presente descripción, “reacción inmunitaria” generalmente significa una respuesta inmunitaria de un paciente a una proteína externa o “no propia”. Esta respuesta inmunitaria incluye una reacción alérgica y el desarrollo de anticuerpos que interfieren con la
 20 eficacia de la enzima de reemplazo. Algunos pacientes pueden no producir ninguna de las proteínas que no funcionan, lo que hace que la enzima de reemplazo sea una proteína “extraña”. Por ejemplo, la inyección repetida de GLA recombinante (rGLA) a los pacientes con enfermedad de Fabry que carecen de GLA frecuentemente da como resultado una reacción alérgica. En otros pacientes, se ha demostrado que la producción de anticuerpos contra la rGLA
 25 disminuye la eficacia de la enzima de reemplazo en el tratamiento de la enfermedad. Véase por

ejemplo Tajima *et al.* ("Use of a Modified α -N-Acetylgalactosaminidase (NAGA) in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease," 85(5) Am. J. Hum. Genet. 569-580 (2009)), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia, que describe el uso de NAGA modificada como la "isoenzima" para reemplazar a la GLA. La NAGA modificada no tiene reactividad inmunológica cruzada con la GLA, y "no reaccionó con el suero de un paciente con enfermedad de Fabry tratado recurrentemente con una GLA recombinante". *Id.*, resumen.

Un "agente inmunosupresor" incluye fármacos y/o proteínas que resultan en la inmunosupresión general y pueden usarse para prevenir materiales de reacción inmunitaria cruzada (CRIM, por sus siglas en inglés) contra enzimas de reemplazo, p. ej., GAA o GLA respectivamente en un paciente con enfermedad de Pompe o enfermedad de Fabry. Los ejemplos no limitantes de un agente inmunosupresor incluyen metotrexato, micofenolato mofetil, ciclofosfamida, agentes alquilantes de ADN de rapamicina, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-BAFF, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, y cualquier combinación de estos.

Los elementos regulatorios, por ejemplo, promotores, que son específicos de un tejido, p. ej., hígado, potencian la expresión de secuencias de ácido nucleico, p. ej., genes, bajo el control de tal elemento regulatorio en el tejido del cual el elemento regulatorio es específico. Los ejemplos no limitantes de un elemento regulatorio específico del hígado, p. ej., promotores específicos del hígado, pueden encontrarse en Chuah *et al.* (2014) *Mol. Ther.* 22:1605-13, cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

El término "proteína" significa cualquier polímero de aminoácido que tenga más de aproximadamente 20 aminoácidos unidos covalentemente a través de enlaces amida. Las proteínas contienen una o más cadenas de polímeros de aminoácidos, conocidas generalmente en la técnica como "polipéptidos". Por lo tanto, un polipéptido puede ser una proteína, y una proteína puede contener múltiples polipéptidos para formar una sola biomolécula funcional. Los

puentes de disulfuro (es decir, entre residuos de cisteína para formar cistina) puede estar presentes en algunas proteínas. Estos enlaces covalentes pueden estar dentro de una sola cadena polipeptídica, o entre dos cadenas polipeptídicas individuales. Por ejemplo, los puentes de disulfuro son esenciales para la adecuada estructura y función de la insulina, las

5 inmunoglobulinas, la protamina, y similares. Para una revisión reciente de la formación de enlaces de disulfuro, véase Oka y Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

Como se usa en la presente descripción, "proteína" incluye proteínas bioterapéuticas, proteínas
10 recombinantes usadas en la investigación o terapia, proteínas trap y otras proteínas de fusión Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, proteínas de fusión scFv, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas, y similares. Las proteínas pueden producirse mediante el uso de sistemas de producción basados
15 en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (p. ej., *Pichia* sp.), sistemas de mamíferos (p. ej., células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión reciente que describe las proteínas bioterapéuticas y su producción, véase Ghaderi *et al.*, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins.

Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 *Biotechnol Genet Eng Rev.*
20 147-75 (2012), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada

25 comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como

HCVR o VH, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCVR o VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera. La región

5 constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1,

10 FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (los CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; los CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a los anticuerpos que tienen una afinidad de unión a su objetivo de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M, según se mide por resonancia de plasmones superficiales, p. ej., BIACORE™ o

15 ELISA de afinidad en solución. El término “anticuerpo” puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo, tales como, p. ej., monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo puede ser de cualquier origen, tal como, p. ej., mamífero o no mamífero. En una modalidad, el anticuerpo puede ser mamífero o aviario. En una modalidad adicional, el anticuerpo puede ser de origen humano y puede ser además un anticuerpo monoclonal humano.

20 La frase “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes, en donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítipo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (p. ej., antígenos) o en la misma molécula (p. ej., en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos

25 diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada

para el primer epítipo será generalmente de al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior que la afinidad de la primera cadena pesada para el segundo epítipo, y viceversa. Los epítipos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en el mismo objetivo o en un objetivo diferente (p. ej., en la misma proteína o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden fabricarse, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas que reconocen epítipos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen epítipos diferentes del mismo antígeno pueden fusionarse a secuencias de ácidos nucleicos que codifican diferentes regiones constantes de cadena pesada, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas cada una con tres CDR de cadena pesada, seguida de (del extremo N al extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere una especificidad de unión a antígenos sino que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítipos unidos por las regiones de unión a antígenos de cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítipos. La frase “cadena pesada”, o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de cualquier otra manera incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de estos. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (del extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento

que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (p. ej., reconocer el antígeno con una KD en el rango micromolar, nanomolar, o picomolar), que es capaz de expresarse y secretarse desde una célula, y que comprende al menos una CDR.

- La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de región constante de cadena ligera de
- 5 inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de cualquier otra manera incluye las cadenas ligeras humanas kappa y lambda. Los dominios variables de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés) incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés), a menos que se especifique de cualquier otra manera. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo
- 10 amino al extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1- FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden usarse con esta invención incluyen p. ej., aquellas que no se unen selectivamente ya sea al primer o al segundo antígeno unido selectivamente por la proteína de unión a antígenos. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden identificarse mediante selección para las
- 15 cadenas ligeras más comúnmente empleadas en genotecas de anticuerpos existentes (genotecas en húmedo o *in silico*), donde las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o la selectividad de los dominios de unión a antígenos de las proteínas de unión a antígenos. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítomos que se unen a las regiones de unión a antígenos de la proteína de unión a antígenos.
- 20 La frase “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulinas (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia desde el extremo N al extremo C (a menos que se indique de cualquier otra manera): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH
- 25 o VL) que tiene una estructura de lámina beta dual en donde las láminas beta se conectan

mediante un enlace de disulfuro entre un residuo de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

La frase “región determinante de complementariedad” o el término “CDR”, incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes

5 inmunoglobulínicos de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (p. ej., un anticuerpo o un receptor de células T). Una CDR puede codificarse, por ejemplo, mediante una secuencia de la línea germinal o una secuencia reorganizada o no reorganizada, y, por ejemplo, mediante una célula T o una célula B madura o
10 sin tratamiento previo. En algunas circunstancias (p. ej., para una CDR3), las CDR pueden codificarse mediante dos o más secuencias (p. ej., secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (p. ej., en una secuencia de ácido nucleico no reorganizada) sino que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de células B, p. ej., como resultado del empalme o conexión de las secuencias (p. ej., recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena
15 pesada).

El término “fragmento de anticuerpo”, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “fragmento de anticuerpo” incluyen (i) un fragmento Fab, un a fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento
20 F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo grupo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) Nature 241:544-546, cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia), que consiste en un dominio VH, (vi)
25 una CDR aislada, y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH,

unidos por un enlazador sintético para formar una sola cadena de proteínas en la cual las regiones de VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como diacuerpos también están abarcados bajo el término “anticuerpo” (véase p. ej., Holliger *et al.* (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994)

5 Structure 2:1121-1123, cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

La frase “proteína que contiene Fc” incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas, y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulinas. Una “porción funcional” se refiere a una región
 10 CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (p. ej., un FcγR; o un FcRn, es decir, un receptor de Fc neonatal), y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene deleciones, sustituciones, y/o inserciones u otras modificaciones que la hacen incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y también incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

15 Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulinas, que incluyen cuando las modificaciones afectan a una o más funciones efectoras de la proteína de unión (p. ej., modificaciones que afectan la unión a FcγR, la unión a FcRn y por lo tanto la vida media, y/o la actividad CDC). Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones y combinaciones de estas, con referencia a la

20 numeración de la UE de una región constante de inmunoglobulinas: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419,
 25 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, y 439.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y exhibe una vida media en suero mejorada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la(s) modificación(es) enumeradas) y tiene una modificación en la posición 250 (p. ej., E o Q); 250 y 428 (p. ej., L o F); 252 (p. ej., L/Y/F/W o T), 254 (p. ej., S o T), y 256 (p. ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (p. ej., L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (p. ej., H/F o Y); o una modificación a 250 y/o 428; o una modificación a 307 o 308 (p. ej., 308F, V308F), y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (p. ej., M428L) y 434S (p. ej., N434S); una modificación 428L, 259I (p. ej., V259I), y 308F (p. ej., V308F); una modificación 433K (p. ej., H433K) y 434 (p. ej., 434Y); una modificación 252, 254, y 256 (p. ej., 252Y, 254T, y 256E); una modificación 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P).

El término “proteína de unión a antígenos”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido o proteína (uno o más polipéptidos complejos en una unidad funcional) que reconoce específicamente un epítipo en un antígeno, tal como un antígeno específico de células y/o un antígeno objetivo de la presente invención. Una proteína de unión a antígenos puede ser multiespecífica. El término “multiespecífico” con referencia a una proteína de unión a antígenos significa que la proteína reconoce epítopos diferentes, ya sea en el mismo antígeno o en antígenos diferentes. Una proteína multiespecífica de unión a antígenos de la presente invención puede ser un solo polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que se asocian covalentemente o no covalentemente entre sí. El término “proteína de unión a antígenos” incluye anticuerpos o fragmentos de estos de la presente invención que pueden unirse a otra molécula funcional o coexpresarse con esta, p. ej., otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este puede estar unido funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más otras entidades moleculares, tales como

una proteína o fragmento de esta para producir una molécula biespecífica o multiespecífica de unión a antígenos con una segunda especificidad de unión.

Como se usa en la presente descripción, el término “epítopo” se refiere a la porción del antígeno que reconoce el polipéptido multiespecífico de unión a antígenos. Un solo antígeno (tal como un polipéptido antigénico) puede tener más de un epítopo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de epítopos estructurales y se definen como aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción entre el polipéptido de unión a antígenos y el antígeno. Los epítopos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. En determinadas modalidades, los epítopos pueden incluir determinantes que son grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo, y, en determinadas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen al exponerse a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con solventes desnaturizantes. El término “dominio” se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular. Preferentemente, los dominios de la presente invención se unen a antígenos diana o específicos de células. Los dominios de unión a antígenos diana o de antígenos específicos de células, y similares, como se usan en la presente descripción, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, obtenibles enzimáticamente, sintéticos, o genéticamente modificados que se una específicamente a un antígeno.

El término “mediocuerpo” o “medio anticuerpo”, que se usan indistintamente, se refiere a la mitad de un anticuerpo, que contiene esencialmente una cadena pesada y una cadena ligera.

Las cadenas pesadas de anticuerpo pueden formar dímeros, por lo tanto la cadena pesada de

un mediocuerpo puede asociarse con la cadena pesada asociada con una molécula diferente (p. ej., otro mediocuerpo) u otro polipéptido que contiene Fc. Dos dominios Fc ligeramente diferentes pueden “heterodimerizarse” como en la formación de anticuerpos biespecíficos u otros heterodímeros, -trímeros, -tetrámeros, y similares. Véase Vincent y Murini, “Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates,” 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (2012); y Shimamoto *et al.*, “Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies,” 4(5) MAbs 586-91 (2012), cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

En una modalidad, el dominio variable del mediocuerpo reconoce específicamente el efector de internalización y el dominio Fc de mediocuerpo se dimeriza con una proteína de fusión Fc que comprende una enzima de reemplazo (p. ej., un pepticuerpo) Id, 586.

El término “fragmento variable de cadena simple” o “scFv” incluye un polipéptido de fusión de cadena simple que contiene una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL). En algunas modalidades, la VH y VL se conectan mediante una secuencia enlazadora de 10 a 25 aminoácidos. Los polipéptidos ScFv también pueden incluir otras secuencias de aminoácidos, tales como regiones CL o CH1. Las moléculas ScFv pueden fabricarse mediante exposición de fagos o fabricarse subclonando directamente las cadenas pesadas y ligeras de un hibridoma o célula B. Ahmad *et al.*, Clinical and Developmental Immunology, volumen 2012, artículo ID 98025 se incorpora en la presente descripción como referencia de los métodos para fabricar fragmentos scFv mediante exposición de fagos y clonación de dominio de anticuerpos.

“Alfa-glucosidasa” (o “ α -glucosidasa”), “actividad de α -glucosidasa”, “GAA”, y “actividad de GAA” se usan indistintamente y se refieren a cualquier proteína que facilite la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa de glucógeno y almidón en glucosa. GAA también se conoce entre otras cosas como EC 3.2.1.20, maltasa, glucoinvertasa, glucosidosacarasa, maltasa-glucoamilasa, alfa-

glucopiranosidasa, glucosidoinvertasa, alfa-D-glucosidasa, alfa-glucosido hidrolasa, alfa-1,4-glucosidasa, y alfa-D-glucósido glucohidrolasa. La GAA puede encontrarse en el lisosoma y en el borde en cepillo del intestino delgado. Los pacientes que padecen de enfermedad de Pompe carecen de α -glucosidasa lisosómica funcional. Véase S. Chiba, "Molecular mechanism in
5 alpha-glucosidase and glucoamylase," 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); y Hesselink *et al.*, "Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II," 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

"Alfa-galactosidasa A" (o " α -galactosidasa A"), "actividad de α -galactosidasa A", " α -

10 galactosidasa", "actividad de α -galactosidasa", "GLA", y "actividad de GLA" se usan indistintamente y se refieren a cualquier proteína que facilite la hidrólisis de fracciones de α -galactosilo de extremo de glicolípidos y glicoproteínas, y también hidroliza α -D-fucósidos. GLA también se conoce entre otras cosas como EC 3.2.1.22, melibiasa, α -D-galactosidasa, α -galactosidasa A, α -galactósido galactohidrolasa, α -D-galactósido galactohidrolasa. GLA es una
15 enzima lisosómica codificada por el gen de GLA unido a X. Los defectos en GLA pueden conducir a enfermedad de Fabry, en la que el glicolípido conocido como globotriaosilceramida (también conocido como Gb3, GL-3, o trihexósido de ceramida) se acumula dentro de los vasos sanguíneos (es decir, vasculopatía prominente), que da como resultado dolor y deterioro en la función del riñón, el corazón, la piel y/o tejidos cerebrovasculares, y otros tejidos y órganos.

20 Véase por ejemplo Prabakaran *et al.* "Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of α -galactosidase A in kidney endothelial cells," 7(6) PLoS One e39975 págs. 1-9 (2012), cuya referencia se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un paciente (o sujeto) que padece de una enfermedad de almacenamiento lisosómico mediante la administración al

25 paciente de una "proteína terapéutica multidominio". La proteína terapéutica multidominio entra

en las células del paciente y administra a los lisosomas una enzima o actividad enzimática que (es decir, “enzima de reemplazo”) reemplaza la enzima (es decir, “enzima endógena”) o actividad enzimática que se asocia con la LSD. En una modalidad, la proteína terapéutica multidominio se entrega al paciente por medio de un vector de terapia génica que contiene un polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio.

Las LSD incluyen esfingolipidosis, mucopolisacaridosis, y enfermedades de almacenamiento de glucógeno. En algunas modalidades, la LSD es una o más cualesquiera de enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher tipo I, enfermedad de Gaucher tipo II, enfermedad de Gaucher tipo III, enfermedad de Niemann-Pick tipo A, enfermedad de Niemann-Pick tipo BGM1-gangliosidosis, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia del activador GM2, GM3-gangliosidosis, leucodistrofia metacromática, deficiencia de activador de esfingolípidos, enfermedad de Scheie, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, síndrome de Morquio A, síndrome de Morquio B, enfermedad de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Sly, MPS IX, y enfermedad de Pompe. En una modalidad específica, la LSD es la enfermedad de Fabry. En otra modalidad, la LSD es la enfermedad de Pompe.

En algunas modalidades, la proteína terapéutica multidominio comprende (a) la enzima de reemplazo, y (b) una entidad molecular que se une a un efector de internalización (dominio de entrega). En algunos casos, la enzima de reemplazo es una o más cualesquiera de α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípido, α -iduronidasa, iduronidasa-2- sulfatasa, heparina *N*-sulfatasa, *N*-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida *N*-acetiltransferasa, *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, y hialuronidasa.

En algunos casos, el paciente puede no producir suficiente proteína de tal manera que una enzima de reemplazo es reconocida por el paciente como “no propia” y ocurre una reacción inmunitaria después de la administración de una enzima de reemplazo. Esto no es deseable. Por lo tanto, en algunas modalidades, la enzima de reemplazo se diseña o se produce de tal manera que evite inducir una reacción inmunitaria en el sujeto. Una solución de este tipo es usar una “isoenzima” como una enzima de reemplazo. Una isoenzima es suficientemente cercana a una proteína “propia” del paciente pero tiene la actividad de enzima de reemplazo suficiente para mejorar los síntomas de la LSD.

En una modalidad particular, en la que la LSD es la enfermedad de Pompe y la enzima endógena es α -glucosidasa (GAA), la isoenzima puede ser una cualquiera de α -glucosidasa ácida, sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB), y α -glucosidasa neutra (C GNAC). En otra modalidad particular, en la que la LSD es la enfermedad de Fabry y la enzima endógena es α -galactosidasa A (GLA), la isoenzima puede ser un α -N-acetilgalactosaminidasa modificada genéticamente para tener actividad de GLA.

En la presente descripción se proporcionan métodos, diferentes a los de usar una isoenzima, para reducir los materiales inmunitarios de reacción cruzada (CRIM, por sus siglas en inglés) contra la enzima de reemplazo. Como se presenta en las Figuras 5 y 6, la administración de una proteína terapéutica multidominio (p. ej., por medio de un vector de terapia génica) que comprende un dominio de unión al efector de internalización y el dominio enzimático reduce el nivel de CRIM contra la enzima de reemplazo comprendida en la administración de una proteína terapéutica de control (que carece del dominio de efector de internalización y que comprende un dominio enzimático). Como tal, en una modalidad de reducir los CRIM contra una enzima en un paciente con una deficiencia en la enzima comprende administrar al paciente una proteína terapéutica multidominio (o ácido nucleico que codifica la misma, p. ej., un vector de terapia génica que contiene un gen que codifica la proteína terapéutica multidominio, en donde la

proteína terapéutica multidominio comprende un dominio de entrega (p. ej., proteína de unión al efector de internalización) y un dominio enzimático.

La proteína terapéutica multidominio tiene un componente de proteína de unión al efector de internalización que permite la absorción de la enzima de reemplazo en la célula. Por lo tanto, en algunas modalidades, el efector de internalización puede ser CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína de mielina y linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptor de leptina, receptores depuradores, SCARA1-5, SCARB1-3 y CD36. En determinados modalidades, el efector de internalización es un internalizador específico del riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina). En otras modalidades determinadas, el efector de internalización es un internalizador específico del músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunas modalidades, el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, o PRLR.

En algunas modalidades, la proteína de unión al efector de internalización comprende una proteína de unión a antígenos, que incluye por ejemplo una molécula de fusión de receptor, una molécula trap, una molécula de fusión Fc de receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula de Fv (scFv) de cadena simple, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad aislada (CDR), un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un anticuerpo específico del dominio, un anticuerpo de dominio simple, un anticuerpo de dominio perdido, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un inmunofármaco modular pequeño (SMIP, por sus siglas en inglés), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada de VHH), y un dominio de IgNAR variable de tiburón.

En una modalidad, la entidad molecular que se une al efector de internalización es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, u otra proteína de unión a antígenos. Por ejemplo, la entidad molecular puede ser un anticuerpo biespecífico, en el que un grupo se une al efector de internalización (p. ej., ITGA7, CD9, CD63, PRLR, APLP2, ASGR1, ASGR2), y el otro grupo se une a la enzima de reemplazo. Aquí, la proteína terapéutica multidominio comprende el anticuerpo biespecífico y la enzima de reemplazo (Figura 1A). En una modalidad específica, la enfermedad tratada es la enfermedad de Fabry, y la proteína terapéutica multidominio comprende GLA y un anticuerpo biespecífico que se une a GLA y CD63. En una modalidad específica, la enfermedad tratada es la enfermedad de Fabry, y la proteína terapéutica multidominio comprende GLA y un anticuerpo biespecífico que se une a GLA e ITGA7. En otra modalidad específica, la enfermedad tratada es la enfermedad de Pompe, y la proteína terapéutica multidominio comprende GAA y un anticuerpo biespecífico que se une a GAA y CD63. En otra modalidad específica, la enfermedad tratada es la enfermedad de Pompe, y la proteína terapéutica multidominio comprende GAA y un anticuerpo biespecífico que se une a

GAA e ITGA7.

En otra modalidad, la entidad molecular que se une al efector de internalización comprende un medio anticuerpo, y la enzima de reemplazo contiene un dominio Fc (polipéptido de fusión Fc de enzima). En una modalidad, el dominio Fc del polipéptido de fusión Fc de enzima se asocia
5 con el dominio Fc del mediocuerpo específico del efector de internalización para formar la proteína terapéutica multidominio (Figura 1B).

En otras modalidades, la enzima de reemplazo se une covalentemente a la proteína de unión al efector de internalización. La modalidad de fusión Fc de enzima:mediocuerpo descrita en el párrafo anterior (véase además la Figura 1B) cae dentro de esta clase, ya que el dímero Fc
10 puede fijarse mediante uno o más puentes de disulfuro. El enlace covalente entre el polipéptido o dominio de actividad enzimática y el polipéptido o dominio de unión de internalización puede ser cualquier tipo de enlace covalente, es decir, cualquier enlace que incluya compartir electrones. En algunos casos, el enlace covalente es un enlace peptídico entre dos aminoácidos, de tal manera que la enzima de reemplazo y la proteína de unión al efector de
15 internalización forman total o parcialmente una cadena polipeptídica continua, como en una proteína de fusión. En algunos casos, la porción de enzima de reemplazo y la proteína de unión al efector de internalización están unidas directamente. En otros casos, se usa un enlazador para unir las dos porciones. Véase Chen *et al.*, “Fusion protein linkers: property, design and functionality,” 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013).

20 El término “enlazador” o “espaciador” se refiere a un polipéptido corto (p. ej., 2 a 25 aminoácidos) que típicamente permite plegar apropiadamente uno o más componentes unidos de la proteína de fusión, p. ej., una VH unida a una VL de un scFv, una proteína terapéutica (p. ej., enzima de reemplazo) unida a un dominio de entrega (p. ej., un anticuerpo anti efector de internalización) de una proteína terapéutica multidominio como se describe en la presente
25 descripción. El enlazador proporciona una región de unión flexible del componente de la

proteína de fusión, lo que permite que los dos extremos de la molécula se muevan independientemente, y puede desempeñar un papel importante en la retención de cada una de las funciones apropiadas de las fracciones. Por lo tanto, la región de unión actúa en algunos casos tanto como enlazador, que combina las dos partes entre sí, y como un espaciador, que

5 permite que cada una de las dos partes forme su propia estructura biológica y no interfiera con la otra parte. Además, la región de unión debe crear un epítipo que el sistema inmunitario del sujeto no reconocerá como extraño, en otras palabras, no se considerará inmunogénico. La selección del enlazador también puede tener un efecto sobre la actividad de unión de la molécula de fusión. (Véase Huston, et al, 1988, *PNAS*, 85:16:5879-83; Robinson & Bates, 1998,

10 *PNAS* 95(11):5929-34; Arai, et al. 2001, *PEDS*, 14(8):529-32; and Chen, X. et al., 2013, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1357–1369.) En una modalidad, el dominio de entrega se conecta al polipéptido terapéutico, o un fragmento de este, mediante uno o más enlazadores peptídicos. En otra modalidad, las regiones variables de un anticuerpo scFv se conectan entre sí, o un fragmento de ellas, mediante uno o más enlazadores peptídicos.

15 La longitud de la cadena enlazadora puede ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15 o más residuos de aminoácidos, pero típicamente está entre 5 y 25 residuos. Ejemplos de enlazadores incluyen enlazadores de poliglicina, tales como Gly-Gly, Gly-Gly-Gly (3Gly), 4Gly, 5Gly, 6Gly, 7Gly, 8Gly o 9Gly. Ejemplos de enlazadores también incluyen enlazadores peptídicos de Gly-Ser tales como Ser-Gly, Gly-Ser, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser,

20 Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n , y (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) n , en donde $n = 1$ a 10. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n y (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) n también se conocen como (G4S) n y (S4G) n , respectivamente.

En algunas modalidades, la proteína terapéutica, p. ej., la enzima de reemplazo, se une

25 covalentemente al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti efector de

internalización (véase la Figura 1C) o al extremo C de la cadena ligera (Figura 1E). En algunas modalidades, la enzima de reemplazo se une covalentemente al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti efector de internalización (véase la Figura 1D) o al extremo N de la cadena ligera (Figura 1F). En algunas modalidades, la enzima se une al extremo C de un dominio scFv anti efector de internalización (Figura 1G).

En algunos casos, especialmente donde la proteína terapéutica, p. ej., la enzima de reemplazo, no se procesa normalmente proteolíticamente en el lisosoma, se añade un enlazador escindible a esas modalidades de la proteína terapéutica multidominio que comprenden una fusión de anticuerpo y enzima. En algunas modalidades, un enlazador escindible de catepsina se inserta entre el anticuerpo y la enzima de reemplazo para facilitar la eliminación del anticuerpo en el lisosoma para a) ayudar posiblemente a preservar la actividad enzimática mediante la eliminación del anticuerpo estéricamente grande y b) aumentar posiblemente la vida media lisosómica de la enzima.

En una modalidad particular, la proteína terapéutica multidominio se entrega al paciente o célula en un vector de terapia génica que contiene un polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio. En una modalidad, la proteína terapéutica multidominio comprende un dominio de entrega y un dominio enzimático. En una modalidad específica, el dominio de entrega se une a un efector de internalización, tal como CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, o CD36. En una modalidad, el dominio de entrega es un fragmento variable de cadena simple (scFv) que se une a CD63 (es decir, scFv anti-CD63). En otra modalidad, el dominio de entrega es un

fragmento variable de cadena simple (scFv) que se une a ITGA7 (es decir, scFv anti-ITGA7).

En una modalidad particular, el dominio enzimático de la proteína terapéutica multidominio comprende una hidrolasa. En una modalidad específica, el dominio enzimático comprende una hidrolasa que es una glicosilasa. En una modalidad más específica, el dominio enzimático
5 comprende una glicosilasa que es una glucosidasa. En una modalidad más específica, el dominio enzimático es una glucosidasa que es alfa-glucosidasa.

Generalmente, en la presente descripción se describen composiciones que comprenden polinucleótidos y usos de ellos, p. ej., (m)ARN, ADN, y formas modificadas de estos, que codifican una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio efector de

10 internalización y un dominio enzimático en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico, p. ej., para la reducción de glucógeno y/o el aumento de la tolerancia inmunitaria de GAA en un paciente con enfermedad de Pompe.

El término "polinucleótido" incluye un polímero de nucleótidos (p. ej., ARN o ADN) que codifica al menos un polipéptido, que incluye polipéptidos de fusión, p. ej., un polipéptido terapéutico
15 multidominio que comprende un dominio de efector de internalización y un dominio enzimático.

El polinucleótido como se usa en la presente descripción abarca polímeros que comprenden tanto nucleótidos modificados como no modificados. Un polinucleótido puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. Un polinucleótido puede purificarse a partir de fuentes naturales, producirse mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes y

20 opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea apropiado, p. ej., en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, un polinucleótido puede comprender análogos de nucleósido tales como análogos que tienen bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones de la cadena principal, etc. Una secuencia de polinucleótidos se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique de cualquier otra manera. En algunas modalidades, un
25 polinucleótido es o comprende nucleósidos naturales (p. ej., adenosina, guanosina, citidina,

uridina); análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (p. ej., bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (p. ej., 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-deoxiribosa, arabinosa, y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (p. ej., enlaces de 5'-N-fosforamidita y fosforotioatos).

En algunas modalidades, un polinucleótido comprende uno o más residuos de nucleótidos no estándar. Los residuos de nucleótidos no estándar pueden incluir, p. ej., 5-metil-citidina ("5mC"), pseudouridina ("ψU"), y/o 2-tio-uridina ("2sU"). Véase, p. ej., la patente de EE. UU. núm.

8,278,036 o WO2011012316, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad como

referencia para una descripción de tales residuos y su incorporación en un polinucleótido. La presencia de residuos de nucleótidos no estándar puede hacer que un polinucleótido sea más

estable y/o menos inmunogénico que un polinucleótido de control con la misma secuencia pero que contiene solo residuos estándar. En modalidades adicionales, un polinucleótido puede comprender uno o más residuos de nucleótidos no estándar seleccionados de isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina, así como combinaciones de estas

modificaciones y otras modificaciones de nucleobases. Ciertas modalidades pueden incluir además modificaciones adicionales al anillo de furanosa o nucleobase. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, modificaciones o sustituciones de azúcar (p. ej., una o más de una modificación de 2'-O-alquilo, un ácido nucleico bloqueado (**LNA**, por sus siglas en inglés)). En algunas modalidades, el polinucleótido puede estar en complejo o hibridado con

polinucleótidos y/o polinucleótidos peptídicos adicionales (**PNA**, por sus siglas en inglés). En

modalidades donde la modificación de azúcar es una modificación de 2'-O-alkilo, tal modificación puede incluir, pero no se limita a una modificación de 2'-desoxi-2'-fluoro, una modificación de 2'-O-metilo, una modificación de 2'-O-metoxietilo y una modificación de 2'-desoxi. En determinadas modalidades, cualquiera de estas modificaciones puede estar
5 presente en 0-100 % de los nucleótidos--por ejemplo, más de 0 %, 1 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de los nucleótidos constituyentes individualmente o en combinación. En algunas modalidades, un polinucleótido comprende moléculas de ARN mensajero (ARNm), que pueden ser o no modificadas, p. ej., que pueden o no comprender un nucleótido modificado, mediante métodos conocidos para aumentar su estabilidad y/o disminuir
10 su inmunogenia. En algunas modalidades, un polinucleótido comprende moléculas de ADN, que pueden ser o no modificadas, p. ej., que pueden o no comprender un nucleótido modificado, mediante métodos conocidos para aumentar su estabilidad y/o disminuir su inmunogenia.

En algunas modalidades, el polinucleótido también incluye una “secuencia de ácido nucleico de
15 direccionamiento al locus”. La secuencia de direccionamiento al locus permite la integración del polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio en el genoma de la célula hospedadora receptora. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento al locus incluye grupos de homología flanqueantes para permitir la recombinación homóloga. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento al locus incluye secuencias de ARN
20 guía y una enzima Cas tipo II para facilitar la integración (es decir, el método CRISPR-Cas9). En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento al locus incluye secuencias de reconocimiento de nucleasas con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés) guía para facilitar la integración. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento al locus incluye secuencias de reconocimiento de nucleasas de efector tipo activador de transcripción
25 (TALEN, por sus siglas en inglés) para facilitar la integración. Aún en otras modalidades, la

secuencia de direccionamiento al locus incluye un solo código de residuo a nucleótido usado por nucleasas derivadas de BuD para facilitar la integración.

En algunas modalidades, el locus genómico en el que se integra el polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio es un “locus de puerto seguro”. En una modalidad, un “locus

5 de puerto seguro” permite una alta expresión de la proteína terapéutica multidominio, mientras que no interfiere con la expresión de genes esenciales ni promueve la expresión de oncogenes u otros genes deletéreos. En una modalidad, el locus genómico está en o cerca del locus de albúmina (Alb) expresada en el hígado, un locus EESYR, un locus SARS, posición 188,083,272 del cromosoma humano 1 o su ortólogo de mamífero no humano, posición 3,046,320 del
10 cromosoma humano 10 o su ortólogo de mamífero no humano, posición 67,328,980 del cromosoma humano 17 o su ortólogo de mamífero no humano, un sitio 1 de virus adeno-asociado (AAVS1) en el cromosoma, un sitio de origen natural de integración de virus AAV en el cromosoma humano 19 o su ortólogo de mamífero no humano, un gen receptor de quimiocina 5 (CCR5), un gen receptor de quimiocina que codifica un coreceptor de HIV-1, o un locus Rosa26
15 de ratón o su ortólogo de mamífero no murino. En una modalidad, el locus genómico es un sitio de virus adeno-asociado. En una modalidad, el locus genómico para la integración se selecciona de acuerdo con el método de Papapetrou y Schambach, J. Molecular Therapy, vol. 24 (4):678-684, abril de 2016, que se incorpora en la presente descripción como referencia para la selección paso a paso de un locus genómico de puerto seguro para la integración de vector
20 de terapia génica; véase también Barzel et al. Nature, vol. 517:360-364, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad, para el direccionamiento génico sin promotor hacia el locus de albúmina (*Alb*) expresada en el hígado.

En algunas modalidades, el polinucleótido, p. ej., ADN, también contiene un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica

25 multidominio. En una modalidad específica, el promotor es un promotor específico del tejido que

impulsa la expresión génica en un tejido particular. En una modalidad, el promotor específico del tejido es un potenciador/promotor específico del hígado derivado de la serpin1 (p. ej., SEQ ID NO:9) y/o es un promotor de TTR (SEQ ID NO:8). En otras modalidades, el promotor es un promotor de CMV. En otras modalidades, el promotor es un promotor de ubiquitina C.

- 5 En una modalidad, el “vector de terapia génica” que codifica una proteína terapéutica multidominio es cualquier vector capaz de entregar el polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio a un huésped, p. ej., un paciente. En algunas modalidades, el vector de terapia génica se dirige a un órgano o célula hospedadora específico, p. ej., para la entrega local, p. ej., entrega específica del tejido. Típicamente, la entrega local requiere que una
- 10 proteína (p. ej., una proteína terapéutica multidominio) codificada por ARNm se traduzca y se exprese principalmente en y/o por un órgano, p. ej., un hígado, mediante lo cual se forma de esta manera un depósito, p. ej., un depósito hepático para la producción (y secreción) de la proteína. En algunas modalidades, un vector de terapia génica administra un polinucleótido de proteína terapéutica multidominio al hígado en un paciente para formar un depósito hepático.
- 15 Véase, p. ej., DeRosa et al. *Gene Therapy*, vol. 10:699-707, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, un vector de terapia génica entrega un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio a un tejido muscular en un paciente. En algunas modalidades, un vector de terapia génica entrega un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio al cerebro de un paciente.
- 20 Cualquier vector de entrega de terapia génica ya conocido o que se desarrolle en el futuro, natural o modificado genéticamente, puede usarse en la práctica de esta invención. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector viral, p. ej., comprende un virus, cápsida vírica, genoma viral, etc. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un polinucleótido desnudo, p. ej., un episoma. En algunas modalidades, el vector de terapia
- 25 génica comprende un complejo de polinucleótidos. Los complejos de polinucleótidos no

limitantes ilustrativos para usar como un vector de terapia génica incluyen lipoplexos, polimersomas, polipexos, dendrímeros, nanopartículas inorgánicas (p. ej., oro, sílice, óxido de hierro, fosfato de calcio, etc. recubiertos con polinucleótidos). En algunas modalidades, un vector de terapia génica como se describe en la presente descripción comprende una

5 combinación de un vector viral, polinucleótidos desnudos, y complejos de polinucleótidos.

En una modalidad, el vector de terapia génica es un virus, que incluye un retrovirus, adenovirus, virus del herpes simple, poxvirus, vaccinia virus, lentivirus, o un virus adeno-asociado. En una modalidad, el vector de terapia génica es un virus adeno-asociado (AAV), que incluye los serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, y AAV11, o

10 variantes modificadas genéticamente o seleccionadas naturalmente de este.

En una modalidad, el polinucleótido también contiene una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV). En una modalidad, el vector de terapia génica es un virus adeno-asociado quimérico que contiene elementos genéticos de dos o más serotipos. Por ejemplo, un vector de AAV con genes rep de genes AAV1 y cap de AAV2 (designados como AAV1/2 o AAV

15 RC1/2) puede usarse como un vector de terapia génica para entregar el polinucleótido de proteína terapéutica multidominio a una célula o una célula de un paciente que lo necesita. En

una modalidad, el vector de terapia génica es un vector viral quimérico AAV1/2, AAV1/3, AAV1/4, AAV1/5, AAV1/6, AAV1/7, AAV1/8, AAV1/9, AAV1/10, AAV1/11, AAV2/1, AAV2/3, AAV2/4, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/10, AAV2/11, AAV3/1, AAV3/2, AAV3/4, AAV3/5, AAV3/6, AAV3/7, AAV3/8, AAV3/9, AAV3/10, AAV3/10, AAV4/1, AAV4/2, AAV4/3, AAV4/5, AAV4/6, AAV4/7, AAV4/8, AAV4/9, AAV4/10, AAV4/11, AAV5/1, AAV5/2, AAV5/3, AAV5/4, AAV5/6, AAV5/7, AAV5/8, AAV5/9, AAV5/10, AAV5/11, AAV6/1, AAV6/2, AAV6/3, AAV6/4, AAV6/5, AAV6/7, AAV6/8, AAV6/9, AAV6/10, AAV6/10, AAV7/1, AAV7/2, AAV7/3, AAV7/4, AAV7/5, AAV7/6, AAV7/8, AAV7/9, AAV7/10, AAV7/11, AAV8/1, AAV8/2,

25 AAV8/3, AAV8/4, AAV8/5, AAV8/6, AAV8/7, AAV8/9, AAV8/10, AAV8/11, AAV9/1, AAV9/2,

AAV9/3, AAV9/4, AAV9/5, AAV9/6, AAV9/7, AAV9/8, AAV9/10, AAV9/11, AAV10/1, AAV10/2, AAV10/3, AAV10/4, AAV10/5, AAV10/6, AAV10/7, AAV10/8, AAV10/9, AAV10/11, AAV11/1, AAV11/2, AAV11/3, AAV11/4, AAV11/5, AAV11/6, AAV11/7, AAV11/8, AAV11/9, AAV11/10, o derivados de este. Gao *et al.*, “Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy,” PNAS 99(18): 11854–11859, 3 de septiembre de 2002, se incorpora en la presente descripción como referencia para vectores de AAV y vectores virales quiméricos útiles como vectores de terapia génica, y se construcción y uso.

En una modalidad más específica, el vector de terapia génica es un vector de AAV quimérico con una secuencia de gen rep de serotipo 2 y una secuencia de cap de serotipo 8 (“AAV2/8” o “AAV RC2/8”).

En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector viral que se ha pseudotipado (p. ej., modificado genéticamente) para dirigirse a una célula específica, p. ej., un hepatocito.

Muchos de los avances en la terapia génica dirigida con el uso de vectores virales pueden resumirse como modificaciones no recombinatorias (no genéticas) o recombinatorias

(genéticas) del vector viral, lo que resulta en el pseudotipado, expansión y/o redireccionamiento del tropismo natural del vector viral. (Explicado en Nicklin y Baker (2002) *Curr. Gene Ther.*

2:273-93; Verheij y Rottier (2012) *Advances Virol* 2012:1-15; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Los enfoques no

genéticos utilizan típicamente un adaptador, que reconoce tanto una proteína de superficie del virus de tipo silvestre (no modificada) como una célula diana. Los pseudoreceptores solubles

(para el virus de tipo silvestre), los polímeros tales como polietilenglicol, y anticuerpos o porciones de estos, se han usado como el dominio de unión al virus de los adaptadores,

mientras que los péptidos naturales o ligandos de vitaminas, y los anticuerpos y porciones de estos se han usado para el dominio de unión a células de los adaptadores descritos

anteriormente. Por ejemplo, el redireccionamiento del vector viral a una célula diana puede

lograrse después de unir el complejo vector:adaptador a una proteína expresada en la superficie de la célula diana, p. ej., una proteína de la superficie celular. Tal enfoque se ha usado para AAV (Bartlett et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 2777-2785), adenovirus (Hemminki et al. (2001) *Cancer Res.* 61: 6377–81; van Beusechem et al. (2003) *Gene Therapy* 10:1982–1991; Einfeld, et al. (2001) *J. Virol.* 75:11284–91; Glasgow et al. (2009) *PLOS One* 4:e8355), herpesvirus (Nakano et al. (2005) *Mol. Ther.* 11:617-24), y paramixovirus (Bian et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:295-303; Bian et al. (2005) *Int. J. Oncol.* 29:1359-69), Coronavirus (Haijema et al. (2003) *J. Virol.* 77:4528–4538; Wurdinger et al. (2005) *Gene Therapy* 12:1394–1404; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

Un enfoque más popular ha sido la modificación genética recombinatoria de proteínas de cápsida vírica y, por lo tanto, la superficie de la cápside vírica. En enfoques recombinatorios indirectos, una cápside vírica se modifica con un “supercóntigo” heterólogo, que después se une a un adaptador. El adaptador se une al supercóntigo y a la célula diana. (Arnold et al. (2006) *Mol. Ther.* 5:125-132; Ponnazhagen et al. (2002) *J. Virol.* 76:12900–907; véase también WO 97/05266 cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia) Los supercóntigos tales como (1) moléculas de unión a Fc (p. ej., receptores Fc, Proteína A, etc.), que se unen al Fc de adaptadores de anticuerpos, (2) (estrept)avidina, que se une a adaptadores biotinilados, (3) biotina, que se une a adaptadores fusionados con (estrept)avidina, y (4) pares de unión de proteína:proteína que forman enlaces peptídicos isométricos tales como SpyCatcher, que se une al adaptador con SpyTag, se han incorporado en Ad (Pereboeva et al. (2007) *Gene Therapy* 14: 627–637; Park et al. (2008) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 769–774; Henning et al. (2002) *Human Gene Therapy* 13:1427–1439; Banerjee et al. (2011) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:4985–4988), AAV (Gigout et al. (2005) *Molecular Therapy* 11:856–865;

Stachler et al. (2008) *Molecular Therapy* 16:1467–1473), y togavirus (Quetglas et al. (2010) *Virus Research* 153:179–196; Ohno et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:763–767; Klimstra et al. (2005) *Virology* 338:9–21; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

- 5 En un enfoque de direccionamiento recombinatorio directo, un ligando de direccionamiento se inserta directamente en, o se acopla a, una cápside vírica, es decir, se modifican cápsides víricas proteicas para expresar un ligando heterólogo. El ligando entonces redirecciona, p. ej., se une, un receptor o marcador preferentemente o se expresa exclusivamente en una célula diana. (Stachler et al. (2006) *Gene Ther.* 13:926–931; White et al. (2004) *Circulation* 109:513–
- 10 519; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia). Enfoques recombinatorios directos se han usado en AAV (Park et al., (2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653–59; Girod et al. (1999) *Nature Medicine* 5:1052–56; Grifman et al. (2001) *Molecular Therapy* 3:964–75; Shi et al. (2001) *Human Gene Therapy* 12:1697–1711; Shi y Bartlett (2003) *Molecular Therapy* 7:515–525, cada una de las referencias se incorpora en
- 15 la presente descripción en su totalidad como referencia), retrovirus (Dalba et al. *Current Gene Therapy* 5:655–667; Tai y Kasahara (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:3083-3095; Russell y Cosset (1999) *Journal of Gene Medicine* 1:300–311; Erlwein et al. (2002) *Virology* 302:333–341; Chadwick et al. (1999) *Journal of Molecular Biology* 285:485–494; Pizzato et al. (2001) *Gene Therapy* 8:1088–1096), poxvirus (Guse et al. (2011) *Expert Opinion on Biological Therapy*
- 20 11:595–608; Galmiche et al. (1997) *Journal of General Virology* 78:3019–3027; Paul et al. (2007) *Viral Immunology* 20:664–671), paramixovirus (Nakamura y Russell (2004) *Expert Opinion on Biological Therapy* 4:1685–1692; Hammond et al. (2001) *Journal of Virology* 75:2087–2096; Galanis (2010) *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 88:620–625; Blechacz y Russell (2008) *Current Gene Therapy* 8:162–175; Russell y Peng (2009) *Current Topics in*
- 25 *Microbiology and Immunology* 330:213–241), y herpesvirus (Shah y Breakefield (2006) *Current*

Gene Therapy 6:361-370; Campadelli-Fiume et al. (2011) *Reviews in Medical Virology* 21:213–226; cada una de las referencias se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

En algunas modalidades, un vector de terapia génica como se describe en la presente

5 descripción se pseudotipa entre aquellos tejidos que son particularmente adecuados para generar una respuesta regulatoria, p. ej., tolerancia a, p. ej., la enzima de reemplazo. Tales tejidos incluyen, pero no se limitan a tejido mucoso, p. ej., tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), células madre hematopoyéticas, y el hígado. En algunas modalidades, el vector de terapia génica, o el gen que codifica una proteína terapéutica

10 multidominio como se describe en la presente descripción se expresa bajo el control de promotores específicos para esos tejidos, p. ej., un promotor específico del hígado.

En algunas modalidades, un vector de terapia génica como se describe en la presente descripción comprende un polinucleótido desnudo. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polinucleótido que codifica un polipéptido terapéutico multidominio puede inyectarse, p. ej., por

15 vía intramuscular, directamente en un órgano para la formación de un depósito, por vía intravenosa, etc. Los métodos adicionales conocidos para la entrega mejorada de polinucleótidos desnudos incluyen, pero no se limitan a electroporación, sonoporación, uso de una pistola de genes para disparar partículas de oro recubiertas de polinucleótidos, magnetofección, y entrega hidrodinámica.

20 En algunas modalidades, un vector de terapia génica como se describe en la presente descripción comprende complejos de polinucleótidos, tales como, pero sin limitarse a, nanopartículas (p. ej., nanopartículas autoensambladas de polinucleótidos, nanopartículas autoensambladas a base de polímeros, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas semiconductoras/metálicas), geles e hidrogeles, complejos de polinucleótidos

25 con cationes y aniones, micropartículas, y cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden formularse como nanopartículas autoensambladas. A modo de ejemplo no limitante, los polinucleótidos pueden usarse para producir nanopartículas que pueden usarse en un sistema de entrega para los polinucleótidos (véase, p. ej., la publicación internacional núm.

5 WO2012125987; que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, las nanopartículas autoensambladas de polinucleótidos pueden comprender un núcleo de los polinucleótidos descritos en la presente descripción y una cubierta polimérica. La cubierta polimérica puede ser cualquiera de los polímeros descritos en la presente descripción y se conocen en la técnica. En una modalidad adicional, la cubierta
10 polimérica puede usarse para proteger los polinucleótidos en el núcleo.

En algunas modalidades, estas nanopartículas autoensambladas pueden ser microesponjas formadas por polímeros largos de horquillas de polinucleótidos que se forman en láminas “plisadas” cristalinas antes de autoensamblarse en microesponjas. Estas microesponjas son esponjas densamente empacadas como micropartículas que pueden funcionar como un

15 portador eficiente y pueden ser capaces de entregar carga a una célula. Las microesponjas pueden tener un diámetro de 1 μm a 300 nm. Las microesponjas pueden estar en complejo con otros agentes conocidos en la técnica para formar microesponjas más grandes. A modo de ejemplo no limitante, la microesponja puede estar en complejo con un agente para formar una capa externa para promover la absorción celular tal como polietilenimina (PEI) policationica.

20 Este complejo puede formar una partícula de 250 nm de diámetro que puede permanecer estable a altas temperaturas (150 °C) (Grabow and Jaegar, Nature Materials 2012, 11:269-269; que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad). Adicionalmente, estas microesponjas pueden ser capaces de exhibir un grado de protección extraordinario contra la degradación por las ribonucleasas. En otra modalidad, las nanopartículas

25 autoensambladas basadas en polímeros tales como, pero sin limitarse a, microesponjas,

pueden ser nanopartículas completamente programables. La geometría, tamaño y estequiometría de la nanopartícula puede controlarse de manera precisa para crear la nanopartícula óptima para la entrega de carga tal como, pero sin limitarse a, polinucleótidos. En algunas modalidades, los polinucleótidos pueden formularse en nanopartículas inorgánicas (patente de EE. UU. núm. 8,257,745, que se incorpora a la presente descripción como referencia en su totalidad). Las nanopartículas inorgánicas pueden incluir, pero no se limitan a, sustancias de arcilla que son hinchables con agua. A modo de ejemplo no limitante, la nanopartícula inorgánica puede incluir arcillas de esmectitas sintéticas que se elaboran a partir de silicatos simples (véase, p. ej., las patentes de EE. UU. núms. 5,585,108 y 8,257,745, las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, un polinucleótido puede formularse en una nanopartícula dispersable en agua que comprende un material semiconductor o metálico (publicación de EE. UU. núm. 20120228565; que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad) o formarse en una nanopartícula magnética (publicación de EE. UU. núms. 20120265001 y 20120283503; cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad). Las nanopartículas dispersables en agua pueden ser nanopartículas hidrófobas o nanopartículas hidrófilas.

En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden encapsularse en cualquier hidrogel conocido en la técnica que puede formar un gel cuando se inyecta en un sujeto. Los hidrogeles son una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas, y a veces se encuentran como un gel coloidal en el cual el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos altamente absorbentes (pueden contener más de 99 % de agua). Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su significativo contenido de agua. El hidrogel descrito en la presente descripción puede usarse para encapsular nanopartículas lipídicas que son biocompatibles,

biodegradables y/o porosas.

A modo de ejemplo no taxativo, el hidrogel puede ser un hidrogel funcionalizado con aptámero.

El hidrogel funcionalizado con aptámero puede programarse para liberar uno o más

polinucleótidos usando hibridación de polinucleótidos. (Battig et al., J. Am. Chem. Society. 2012

5 134:12410-12413; que se incorpora en la presente descripción como referencia en su

totalidad). En algunas modalidades, el polinucleótido puede encapsularse en una nanopartícula lipídica y luego la nanopartícula lipídica puede encapsularse en un hidrogel.

En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden

encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel de fibrina o pegamento de fibrina. En otra modalidad,

10 los polinucleótidos pueden formularse en una nanopartícula lipídica o una nanopartícula lipídica

eliminada rápidamente antes de encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel de fibrina o un

pegamento de fibrina. En aún otra modalidad, los polinucleótidos pueden formularse como un

lipoplex antes de encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel o un pegamento de fibrina. Los

geles, hidrogeles y pegamentos de fibrina comprenden dos componentes, una solución de

15 fibrinógeno y una solución de trombina que es rica en calcio (véase p. ej., Spicer and Mikos,

Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd et al. Journal of Controlled Release 2012.

157:80-85; cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en

su totalidad). La concentración de los componentes del gel, hidrogel y/o pegamento de fibrina

puede alterarse para cambiar las características, el tamaño de la malla de la red, y/o las

20 características de degradación del gel, hidrogel y/o pegamento tal como, pero sin limitarse a,

cambiar las características de liberación del gel, hidrogel y/o pegamento de fibrina. (Véase p.

ej., Spicer y Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd et al. Journal of

Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas et al. Tissue Engineering 2008. 14:119-128; cada

una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad). Esta

25 característica puede ser ventajosa cuando se usa para entregar el polinucleótido descrito en la

presente descripción. (Véase p. ej., Kidd et al. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas et al. Tissue Engineering 2008. 14:119-128; cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, un polinucleótido descrito en la presente descripción puede incluir

5 cationes o aniones. En una modalidad, las formulaciones incluyen cationes metálicos tales como, pero sin limitarse a, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{+} y combinaciones de estos. A modo de ejemplo no limitante, las formulaciones pueden incluir polímeros y un polinucleótido en complejo con un catión metálico (véase p. ej., las patentes de EE. UU. núms. 6,265,389 y 6,555,525, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su

10 totalidad).

En algunas modalidades, un polinucleótido puede formularse en nanopartículas y/o micropartículas. Estas nanopartículas y/o micropartículas pueden moldearse en cualquier forma, tamaño y química. Como un ejemplo, las nanopartículas y/o micropartículas pueden fabricarse mediante el uso de la tecnología PRINT® de LIQUIDA TECHNOLOGIES.RTM. (Morrisville,

15 N.C.) (Véase p. ej., la publicación internacional núm. WO2007024323; incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden formularse en NanoJackets y NanoLiposomas de Keystone Nano (State College, Pa.). Las NanoJackets están hechas de compuestos que se encuentran naturalmente en el cuerpo que

20 incluyen calcio, fosfato y también pueden incluir una pequeña cantidad de silicatos. Las NanoJackets pueden variar en tamaño de 5 a 50 nm y pueden usarse para entregar compuestos hidrófilos e hidrófobos tales como, pero sin limitarse a, polinucleótidos, construcciones y/o polinucleótidos primarios. Los NanoLiposomas están hechos de lípidos tales como, pero sin limitarse a, lípidos que se encuentran naturalmente en el cuerpo. Los

25 NanoLiposomas pueden variar en tamaño de 60 a 80 nm y pueden usarse para entregar

compuestos hidrófilos e hidrófobos tales como, pero sin limitarse a, polinucleótidos, construcciones y/o polinucleótidos primarios. En un aspecto, los polinucleótidos descritos en la presente descripción se formulan en un NanoLiposoma tal como, pero sin limitarse a, NanoLiposomas de Ceramida.

- 5 En una modalidad, la proteína terapéutica multidominio es una proteína de fusión scFv-GAA anti-CD63 o una proteína de fusión scFv-GAA anti-ITGA7. La administración de la proteína de fusión scFv-GAA anti-CD63 o la proteína de fusión scFv-GAA anti-ITGA7 a través de la entrega de AAV proporciona una producción estable a largo plazo de GAA en el suero del paciente después de la administración del vector de terapia génica de puerto de proteínas terapéuticas multidominio. En una modalidad, el nivel de GAA en el suero del paciente receptor es ≥ 1.5 veces a 100 veces, ≥ 1.5 veces a 10 veces, ≥ 2.5 veces, 2.5 veces – 3 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3.0 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces mayor que los niveles en suero de un paciente que recibe GAA no
- 10
- 15 unido a un dominio de entrega después de 1 mes, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o 6 meses después de la administración del vector de terapia génica de puerto de proteínas terapéuticas multidominio.

- En una modalidad, la administración de la proteína de fusión scFv-GAA anti-CD63 o la proteína de fusión scFv-GAA anti-ITGA7 a través de la entrega de AAV proporciona una reducción estable a largo plazo en los niveles de glucógeno almacenado en pacientes con enfermedad de Pompe. En una modalidad, los niveles de glucógeno en el corazón, músculos esqueléticos, y el tejido hepático en el paciente se reducen a niveles de tipo silvestre (sin enfermedad). En una modalidad, los niveles de glucógeno en el corazón, músculos esqueléticos, y el tejido hepático en el paciente se mantienen a niveles de tipo silvestre 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5
- 20
- 25 meses, o 6 meses después de la administración del vector de terapia génica de puerto de

proteínas terapéuticas multidominio.

En una modalidad, la administración de la proteína de fusión scFv-GAA anti-CD63 o la proteína de fusión scFv-GAA anti-ITGA7 a través de la administración de AAV proporciona una restauración a largo plazo de la fuerza muscular en pacientes con enfermedad de Pompe. En

5 una modalidad, la fuerza del paciente según se mide por la fuerza de agarre se restaura a la normalidad (es decir, niveles normales sin enfermedad) 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o 6 meses después de la administración del vector de terapia génica de puerto de proteínas terapéuticas multidominio.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una actividad

10 enzimática y una proteína de unión a antígenos, en donde la enzima se asocia con una enfermedad de deficiencia de enzima (LSD) y una proteína de unión al efector de

internalización. Las enzimas (que incluyen proteínas que no son catalíticas *per se*) asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen por ejemplo cualquiera y todas las hidrolasas, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, activador de

15 saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, sintasa GM3, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina *N*-sulfatasa, *N*-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida *N*-acetiltransferasa, *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa, y similares.

20 Las proteínas de unión al efector de internalización por ejemplo incluyen una molécula de fusión de receptor, una molécula trap, una molécula de fusión Fc de receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula de Fv (scFv) de cadena simple, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad aislada (CDR), un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un anticuerpo

25 específico del dominio, un anticuerpo de dominio simple, un anticuerpo de dominio perdido, un

anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un inmunofármaco modular pequeño (SMIP), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada de VHH), un dominio de IgNAR variable de tiburón, otras

5 proteínas de unión a antígenos, y similares.

Los efectores de internalización incluyen por ejemplo CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína de mielina y

10 linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptor de leptina, receptores depuradores, SCARA1-5, SCARB1-3 y CD36. En determinados modalidades, el efector de internalización es un internalizador específico del riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13

15 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina). En otras modalidades determinadas, el efector de internalización es un internalizador específico del músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1,

20 CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3

25 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunas modalidades, el efector de

internalización es ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, ASGR1, ASGR2 o PRLR.

En algunas modalidades, la enzima se une covalentemente (es decir, electrones compartidos entre átomos) a la proteína de unión a antígenos. En una modalidad particular, la proteína de unión al efector de internalización consiste en o contiene un mediocuerpo; la enzima se fusiona a un dominio de fusión Fc (p. ej., en el extremo C); y el dominio Fc que se une covalentemente a la enzima se asocia con el dominio Fc de la proteína de unión a antígenos, de tal manera que la asociación contiene uno o más puentes de disulfuro. Esta modalidad particular se ilustra esquemáticamente en la Figura 1A, panel B.

En otra modalidad particular, la proteína de unión al efector de internalización (dominio de entrega) consiste en o contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, y la enzima se une covalentemente al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una modalidad específica, el dominio de entrega es un anticuerpo, y la enzima se une covalentemente (directamente a través de un enlace peptídico, o indirectamente por medio de un enlazador) al extremo C de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo (Figura 1A, paneles C o E, respectivamente). En otra modalidad específica, el dominio de entrega es un anticuerpo, y la enzima se une covalentemente (directamente a través de un enlace peptídico, o indirectamente por medio de un enlazador) al extremo N de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo (Figura 1A, paneles D o F, respectivamente).

En algunas modalidades, la enzima y el dominio de entrega no se unen covalentemente, sino que se combinan en una mezcla. El dominio de entrega y la enzima pueden asociarse a través de fuerzas no covalentes para formar un complejo. Por ejemplo, en una modalidad particular, el dominio de entrega es un anticuerpo biespecífico en el que un grupo del anticuerpo se une al efector de internalización y el otro grupo se une a la enzima. Esta modalidad se ilustra esquemáticamente en la Figura 1A, panel A.

En algunas modalidades, la enzima es GAA o comprende actividad de GAA (p. ej., una

isoenzima con actividad de GAA), y el efector de internalización es ITGA7, CDH15, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2 o PRLR. En una modalidad particular, la enzima es GAA o comprende actividad de GAA, el dominio de internalización es CD63, y el dominio de entrega es un anticuerpo biespecífico con especificidad para CD63 y GAA. En una modalidad particular, la enzima es GAA o comprende actividad de GAA, el dominio de internalización es ITGA7, y el dominio de entrega es un anticuerpo biespecífico con especificidad para ITGA7 y GAA. En algunas modalidades, la enzima es GLA o comprende actividad de GLA (p. ej., una isoenzima con actividad de GAA), y el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, o PRLR. En una modalidad particular, la enzima es GLA o comprende actividad de GLA, el dominio de internalización es CD63, y el dominio de entrega es un anticuerpo biespecífico con especificidad para CD63 y GLA. En una modalidad particular, la enzima es GLA o comprende actividad de GLA, el dominio de internalización es ITGA7, y el dominio de entrega es un anticuerpo biespecífico con especificidad para ITGA7 y GLA.

Composiciones farmacéuticas y administración de estas

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en la presente descripción, incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, diluyentes, u otros vehículos líquidos, dispersión o auxiliares de suspensión, agentes activos en la superficie, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según corresponda para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21.sup.st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad) describe varios excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de estas. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como

mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseado o la interacción de cualquier otra manera en una manera deletérea con cualquier otro(s) componente(s) de la composición farmacéutica, se contempla que su uso esté dentro del alcance de esta invención.

En algunas modalidades, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos 95 %, al

5 menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % puro. En algunas

modalidades, un excipiente está aprobado para su uso en seres humanos y para uso

veterinario. En algunas modalidades, un excipiente está aprobado por la Administración de

Alimentos y Medicamentos de EE. UU. En algunas modalidades, un excipiente es de grado

farmacéutico. En algunas modalidades, un excipiente cumple con los estándares de la

10 Farmacopea de Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Europea (EP,

por sus siglas en inglés), la Farmacopea Británica, y/o la Farmacopea Internacional.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de composiciones

farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o

granulantes, agentes activos en la superficie y/o emulsionantes, agentes desintegrantes,

15 agentes aglutinantes, conservantes, agentes amortiguadores, agentes lubricantes, y/o aceites.

Tales excipientes pueden incluirse opcionalmente en composiciones farmacéuticas.

Los diluyentes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de

sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, fosfato hidrógeno de calcio, lactosa

de fosfato de sodio, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol,

20 inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, etc., y/o

combinaciones de estos.

Los agentes granulantes y/o dispersantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, almidón de

papa, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón de sodio, arcillas, ácido

algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, productos de madera y celulosa, esponja

25 natural, resinas de intercambio de cationes, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio,

poli(vinil-pirrolidona) (crospovidona) reticulada, almidón de carboximetilo de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio (croscarmelosa) reticulada, metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, magnesio aluminio silicato

- 5 (VEEGUM®), lauril sulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o combinaciones de estos.

Los emulsionantes y/o agentes activos en la superficie ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, emulsionantes naturales (p. ej. acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, chondrus, colesterol, xantana, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana,

- 10 colesterol, cera, y lecitina), arcillas coloidales (p. ej. bentonita [silicato de aluminio] y VEEGUM® [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (p. ej. alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo, y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (p. ej. carboxi polimetileno, ácido poliacrílico,
- 15 polímero de ácido acrílico, y polímero de carboxivinilo), carragenano, derivados celulósicos (p. ej. carboximetilcelulosa de sodio, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitano (p. ej. monolaurato de sorbitano de polioxietileno [TWEEN® 20], sorbitano de polioxietileno [TWEEN® 60], monooleato de sorbitano de polioxietileno [TWEEN® 80], monopalmitato de sorbitano
- 20 [SPAN® 40], monoestearato de sorbitano [SPAN® 60], triestearato de sorbitano [SPAN® 65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitano [SPAN® 80]), ésteres de polioxietileno (p. ej. monoestearato de polioxietileno [MYRJ® 45], aceite de castor hidrogenado de polioxietileno, aceite de castor polietoxilado, estearato de polioximetileno, y SOLUTOL®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (p. ej. CREMOPHOR®), éteres
- 25 de polioxietileno, (p. ej. lauril éter de polioxietileno [BRIJ® 30]), poli(vinil-pirrolidona),

monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, PLUORINC® F 68, POLOXAMER® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o combinaciones de estos.

- 5 Los agentes aglutinantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, almidón (p. ej. almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (p. ej. sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol,); gomas naturales y sintéticas (p. ej. acacia, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinil-pirrolidona), silicato de aluminio y magnesio (Veegum®), y arabogalactano de lárice); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de estos.
- 10

Los conservantes ilustrativos pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes

- 15 quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos, y/u otros conservantes. Los antioxidantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, y/o sulfito de sodio. Los
- 20 agentes quelantes ilustrativos incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés), monohidrato de ácido cítrico, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico, y/o edetato trisódico.

Los conservantes antimicrobianos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de

- 25 cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina,

hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato de fenilmercúrico, propilenglicol, y/o timerosal. Los conservantes antifúngicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, butil parabeno, metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio, y/o ácido sórbico. Los conservantes de alcohol ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato, y/o alcohol feniletílico. Los conservantes ácidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido dehidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico, y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA, por sus siglas en inglés), hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS, por sus siglas en inglés), lauril éter sulfato de sodio (SLES, por sus siglas en inglés), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, GLYDANT PLUS® , PHENONIP® , metilparabeno, GERMALL® 115, GERMABEN® II, NEOLONE.TM., KATHON.TM., y/o EUXYL® .

Los agentes amortiguadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, soluciones amortiguadoras de citrato, soluciones amortiguadoras de acetato, soluciones amortiguadoras de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido D-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de

magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógeno, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, etc., y/o combinaciones de estos.

Los agentes lubricantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behanato de glicerilo, aceites vegetales

- 5 hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, etc., y combinaciones de estos.

Los aceites ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, aceites de almendra, semilla de albaricoque, aguacate, babasu, bergamota, semilla de grosella negra, borraja, miera, manzanilla, canola, alcaravea, carnaúba, castor, canela, manteca de cacao, coco, hígado de

- 10 bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, linaza, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, isopropil miristato, jojoba, nuez de la India, lavandín, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malváceas, semilla de mango, semilla de limnanthes, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, palmiste, semilla de durazno, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, colza, salvado de arroz, romero,
- 15 cártamo, sándalo, sasanqua, saturejas, espinoso amarillo, sésamo, karité, silicona, frijol de soya, girasol, árbol de té, cardo, tsubaki, vetiver, nuez, y germen de trigo. Los aceites ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol de oleilo, aceite de silicona, y/o combinaciones de estos.

- 20 Excipientes tales como manteca de cacao y ceras supositorias, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, endulzantes, saborizantes, y/o agentes perfumantes pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Entrega

La presente descripción abarca la entrega del vector de terapia génica (p. ej., los

- 25 polinucleótidos) por cualquier vía adecuada teniendo en cuenta posibles avances en las

ciencias de la entrega de fármacos. La entrega puede ser desnuda o formulada.

Entrega desnuda

Los polinucleótidos de la presente invención pueden entregarse a una célula desnuda. Como se usa en la presente descripción, "desnudo" se refiere a entregar polinucleótidos libres de agentes que promueven la transfección. Por ejemplo, los polinucleótidos entregados a la célula pueden no contener modificaciones. Los polinucleótidos desnudos pueden entregarse a la célula mediante el uso de vías de administración conocidas en la técnica y descritas en la presente descripción.

Entrega formulada

Los polinucleótidos pueden formularse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. Las formulaciones pueden contener polinucleótidos y pueden incluir, además, pero no se limitan a, agentes de penetración de células, un portador farmacéuticamente aceptable, un agente de entrega, un polímero bioerosionable o biocompatible, un solvente y un depósito de entrega de liberación sostenida. El ARNm de polinucleótidos formulados puede entregarse a la célula mediante el uso de vías de administración conocidas en la técnica y descritas en la presente descripción.

Administración

Los polinucleótidos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía que resulte en un resultado terapéuticamente eficaz. Estas incluyen, pero no se limitan a enteral, gastroentérica, epidural, oral, transdérmica, epidural (peridural), intracerebral (en el telencéfalo), intracerebroventricular (en los ventrículos cerebrales), epicutánea (aplicación en la piel), intradérmica, (en la misma piel), subcutánea (debajo de la piel), administración nasal (a través de la nariz), intravenosa (en una vena), intraarterial (en una arteria), intramuscular (en un músculo), intracardiaca (en el corazón), infusión intraósea (en la médula ósea), intratecal (en el

cavidad espinal), intraperitoneal, (infusión o inyección en el peritoneo), infusión intravesical,

intravítrea, (a través del ojo), inyección intracavernosa, (en la base del pene), administración intravaginal, intrauterina, administración extraamniótica, transdermal (difusión a través de la piel intacta para la distribución sistémica), transmucosal (difusión a través de una membrana mucosa), insuflación (inhalación), sublingual, sublabial, enema, gotas oftálmicas (en la conjuntiva), o en gotas óticas. En modalidades específicas, las composiciones pueden administrarse de una manera que les permite cruzar la barrera hematoencefálica, la barrera vascular, u otra barrera epitelial. Las vías de administración no limitantes para los polinucleótidos, construcciones primarias o ARNm de la presente invención se describen a continuación.

10 Administración parenteral e inyectable

Las formas de dosificación líquida para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elíxires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germinal, oliva, castor, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, endulzantes, saborizantes y/o agentes perfumantes. En determinadas modalidades de la administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros, y/o combinaciones de estos.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones, y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o solventes no tóxicos y aceptables por vía parenteral, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P., y solución de cloruro de sodio isotónico. Los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite fijo blando que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como ácido oleico pueden usarse en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, y/o incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Para prolongar el efecto de un principio activo, a menudo es deseable enlentecer la absorción del principio activo de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua.

Entonces la velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retrasada de una forma del fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite. Las formas de depósito inyectable se elaboran mediante la formación de matrices de microencapsulación del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación del fármaco con respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular usado, puede

controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos del cuerpo.

5 Administración de depósito

Tal como se describe en la presente descripción, en algunas modalidades, la composición se formula en depósitos para la liberación extendida. Generalmente, un órgano o tejido específico (un "tejido diana") es dirigido en la administración.

En algunos aspectos de la invención, los polinucleótidos se retienen espacialmente dentro o
10 cerca de un tejido diana. Se proporciona un método para proporcionar una composición a un tejido diana de un sujeto mamífero poniendo en contacto el tejido diana (que contiene una o más células diana) con la composición en condiciones de tal manera que la composición, en particular el o los componentes de ácido nucleico de la composición, se retenga
sustancialmente en el tejido diana, lo que significa que el tejido diana retiene al menos 10, 20,
15 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99 o más de 99.99 % de la composición. Ventajosamente, la retención se determina midiendo la cantidad del ácido nucleico presente en la composición que entra en una o más células diana. Por ejemplo, al menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99 o más de 99.99 % de los ácidos nucleicos administrados al sujeto están presentes intracelularmente en
20 un período de tiempo después de la administración. Por ejemplo, la inyección intramuscular a un sujeto mamífero se realiza mediante el uso de una composición acuosa que contiene un polinucleótido y un reactivo de transfección, y la retención de la composición se determina midiendo la cantidad del ácido ribonucleico presente en las células musculares.

Los aspectos de la invención se dirigen a métodos para proporcionar una composición a un
25 tejido diana de un sujeto mamífero, mediante el contacto del tejido diana (que contiene una o

más células diana) con la composición en condiciones de tal manera que la composición se retiene sustancialmente en el tejido diana. La composición contiene una cantidad eficaz de un polinucleótido de tal manera que el polipéptido de interés se produzca en al menos una célula diana. Las composiciones generalmente contienen un agente de penetración de células,

5 aunque también se contempla el ácido nucleico "desnudo" (tal como ácidos nucleicos sin un agente de penetración de células u otro agente), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas circunstancias, la cantidad de una proteína producida por las células en un tejido se aumenta deseablemente. Preferentemente, este aumento en la producción de proteínas se restringe espacialmente a las células dentro del tejido diana. Por lo tanto, se proporcionan

10 métodos para aumentar la producción de una proteína de interés en un tejido de un sujeto mamífero. Se proporciona una composición que contiene polinucleótidos caracterizados porque se ha determinado que una cantidad unitaria de la composición produce el polipéptido de interés en un porcentaje sustancial de células contenidas dentro de un volumen predeterminado del tejido diana.

15 En algunas modalidades, la composición incluye una pluralidad de polinucleótidos diferentes, donde uno o más de los polinucleótidos codifican un polipéptido de interés. Opcionalmente, la composición también contiene un agente de penetración de células para ayudar en la entrega intracelular de la composición. Se hace una determinación de la dosis de la composición requerida para producir el polipéptido de interés en un porcentaje sustancial de células

20 contenidas dentro del volumen predeterminado del tejido diana (generalmente, sin inducir una producción significativa del polipéptido de interés en el tejido adyacente al volumen predeterminado, o distalmente del tejido diana). Después de esta determinación, la dosis determinada se introduce directamente en el tejido del sujeto mamífero.

En una modalidad, la invención proporciona que los polinucleótidos se entreguen en más de

25 una inyección o mediante inyecciones de dosis divididas.

En una modalidad, la invención puede retenerse cerca del tejido diana mediante el uso de un depósito de fármacos desechable pequeño, bomba de parches o bomba osmótica. Los ejemplos no limitantes de bombas de parches incluyen aquellas elaboradas y/o comercializadas por BD® (Franklin Lakes, N.J.), Insulet Corporation (Bedford, Mass.), SteadyMed Therapeutics (San Francisco, Calif.), Medtronic (Minneapolis, Minn.) (p. ej., MiniMed), UniLife (York, Pa.), Valeritas (Bridgewater, N.J.), y SpringLeaf Therapeutics (Boston, Mass.). Un ejemplo no limitante de una bomba osmótica incluye aquellas elaboradas por DURECT® (Cupertino, Calif.) (p. ej., DUROS® y ALZET®).

Dosificación

- La presente invención proporciona métodos que comprenden administrar un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido terapéutico multidominio, y opcionalmente posteriormente el polipéptido terapéutico multidominio a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, un método comprende administrar un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido terapéutico multidominio en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que lo necesita, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para eliminar la administración posterior del polipéptido terapéutico multidominio. En consecuencia, en algunas modalidades, un método para tratar a un paciente que lo necesita que carece de una enzima, p. ej., reducir los niveles de glucógeno y/o reducir el CRIM con respecto a la GAA en un paciente con enfermedad de Pompe, comprende administrar al paciente un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende la enzima de reemplazo, p. ej., una proteína de fusión scFv::GAA anti-CD63, p. ej., una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO:11, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz niega la necesidad de la administración posterior al paciente de la enzima de reemplazo, p. ej., GAA o derivados de esta. En algunas

modalidades, un método para tratar a un paciente que carece de una enzima y que la necesita, p. ej., reducir los niveles de glucógeno y/o reducir el CRIM con respecto a la GAA en un paciente con enfermedad de Pompe, comprende administrar al paciente un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio que

5 comprende una enzima de reemplazo, p. ej., una proteína de fusión scFv::GAA anti-CD63, p. ej., una proteína terapéutica multidominio que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO:11, en una cantidad terapéuticamente eficaz, y comprende además administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima de reemplazo. Los ácidos nucleicos, proteínas o complejos, o composiciones farmacéuticas, de imagenología, de diagnóstico o

10 profilácticas de estos, pueden administrarse a un sujeto mediante el uso de cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar, o tomar imágenes de una enfermedad, trastorno, y/o afección (p. ej., una enfermedad, trastorno, y/o afección relacionados con los déficits de memoria de trabajo).

La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y

15 condición general del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad, y similares.

La dosis de vectores virales de AAV, p. ej., las unidades de dosis en genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), requeridas para lograr un efecto deseado o "efecto terapéutico" (p. ej., una determinada concentración en suero de una enzima de reemplazo)

20 variarán con base en varios factores que incluyen, pero no se limitan a: la vía de la administración de AAV, el nivel de expresión requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que se trata, y la estabilidad de la proteína terapéutica multidominio de expresión. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un rango de dosis de virión de AAV para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular

25 basado en los factores mencionados anteriormente, así como otros factores que son conocidos

en la técnica, véase, p. ej., CDER “Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers,” julio de 2005, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia. Una cantidad efectiva del AAV está generalmente en el rango de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 100 ml de solución que contiene de aproximadamente 10^9 a 10^{16} copias del genoma por sujeto. Pueden usarse otros volúmenes de solución. El volumen usado típicamente dependerá, entre otras cosas, del tamaño del sujeto, la dosis del AAV, y la vía de administración. En algunas modalidades, una dosificación de entre alrededor de 10^{10} a 10^{12} del genoma viral de AAV por sujeto es apropiada. En algunas modalidades el AAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , o 10^{15} copias del genoma por sujeto. En algunas modalidades el AAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o 10^{14} genomas virales por kg. En algunas modalidades, se administra al menos 2×10^{12} genomas virales por kilogramo (vg/kg). En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero umbral de proteína terapéutica multidominio. En algunas modalidades el nivel en suero umbral de proteína terapéutica es de al menos 1 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 2 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 3 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 4 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 5 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 6 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 7 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 8 µg/ml. En algunas

modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 9 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 10 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 11 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 12 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 13 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 14 µg/ml. En algunas modalidades, la dosis administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio mayor que 15 µg/ml.

Las composiciones de acuerdo con la invención se formulan típicamente en una forma de unidad de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso queaue die total de las composiciones de la presente invención puede ser decidido por el médico que asiste dentro del alcance del sano juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz, profilácticamente eficaz, o de imagen apropiado para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o en coincidencia con el compuesto específico empleado; y factores similares conocidos en la técnica médica.

Las modalidades no limitantes e ilustrativas se enumeran a continuación.

Modalidad 1. Un método para entregar una proteína terapéutica al sistema nervioso

central (CNS) de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de nucleótido que codifica una proteína terapéutica multidominio a través de un método de entrega dirigido al hígado suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica multidominio en el CNS, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende un dominio de entrega y un dominio enzimático.

Modalidad 2. El método de la modalidad 1, en donde el dominio de entrega es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a un efector de internalización.

Modalidad 3. El método de la modalidad 1 o la modalidad 2, en donde la proteína terapéutica es una enzima lisosómica.

Modalidad 4. El método de la modalidad 3, en donde la enzima lisosómica es GAA.

Modalidad 5. El método de una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la composición de nucleótido se administra a través de un vector viral, opcionalmente en donde la composición de nucleótido se administra a una dosis de al menos 2×10^{12} genomas virales por kilogramo (vg/kg).

Modalidad 6. El método de la modalidad 5, en donde el vector viral es un vector de AAV.

Modalidad 7. El método de una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde el efector de internalización se expresa en la superficie de las células seleccionadas del grupo que consiste en: células en el CNS, células epiteliales, y células que cruzan la barrera hematoencefálica.

Modalidad 8. El método de una cualquiera de las modalidades 1-7, en donde el dominio de entrega se une a un efector de internalización

(i) seleccionado del grupo que consiste en CD63, Integrina alfa-7 (ITGA7), MHC-I,

Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL,

receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), proteína de mielina y linfocitos (MAL), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, y CD36;

(ii) expresado en varios tipos de tejido, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CD63, MHC-I, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, IGF2R, Integrina alfa-7 (ITGA7), LRP5, LRP6, LRP8, Kremen-2, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR, MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), receptores de toxina diftérica, HBEGF (factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina), receptores de glutatona, receptores de glutamato, receptores de leptina, y receptores de folato,

opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIID, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, enfermedad de Pompe, deficiencia de lipasa ácida lisosómica, leucodistrofia metacromática, enfermedades de Niemann-Pick tipos A, B, y C2, Alfa mannosidosis, deficiencia de neuraminidasa, sialidosis, aspartilglucosaminuria, deficiencia combinada de saposina, enfermedad de Gaucher atípica, lipogranulomatosis de Farber, fucosidosis, y Beta mannosidosis;

(iii) expresado preferentemente en huesos y/o cartílagos, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en colágeno X, Integrina alfa 10 (ITGA10), receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), isoforma C del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3C), proteína 1 de enlace a proteoglicano y hialuronano (CRT1L), Agrecano, Colágeno II, y Kremen-1,

opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, Beta manosidosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, aspartilglicosaminuria, lipogranulomatosis de Farber, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, y alfa manosidosis;

(iv) preferentemente expresado en monocitos, macrófagos, o microglía, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, CD36, MSR1 (receptor depurador 1 de macrófagos), MRC1 (receptor 1 de manosa de macrófagos), VSIG4 (proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y V-set), CD68 (macrosialina), y CSF1R (receptor del factor 1 de estimulación de colonia de macrófagos),

opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de lipasa ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, y lipogranulomatosis de Farber;

(v) expresado preferentemente en células renales, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Kloto), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina),

opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas o se diagnostica con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Fabry, síndrome de Alport, enfermedad renal poliquística, y púrpura trombocitopénica trombótica;

(vi) expresado preferentemente en células hepáticas, opcionalmente ASGR1 o ASGR2, opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas de o es diagnosticado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de lipasa ácida lisosómica, enfermedad de Gaucher, MPS VI, MPS VII, MPS II, enfermedades de Niemann-

Pick tipos A, B, y C2, sialidosis, deficiencia de neuraminidasa, enfermedad de Gaucher atípica, deficiencia combinada de saposina, lipogranulomatosis de Farber;

(vii) preferentemente expresado en células musculares, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye),

opcionalmente en donde el sujeto exhibe uno o más síntomas o es diagnosticado con enfermedad de Pompe;

(viii) seleccionado del grupo que consiste en ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, MSR1, ASGR1, ASGR2, o PRLR; o

(ix) que es CD63.

Modalidad 9. El método de una cualquiera de las modalidades 1-8, en donde el dominio de entrega es un fragmento variable de cadena simple (scFv).

Modalidad 10. El método de una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde la proteína de unión a receptores de la superficie celular (CSR) (CSR-BP) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

Modalidad 11. El método de una cualquiera de las modalidades 1-10, en donde la proteína terapéutica comprende una hidrolasa.

Modalidad 12. El método de una cualquiera de las modalidades 1-11, en donde la

proteína terapéutica comprende una glicosilasa.

Modalidad 13. El método de una cualquiera de las modalidades 1-12, en donde la proteína terapéutica comprende una glucosidasa.

5 Modalidad 14. El método de una cualquiera de las modalidades 1-13, en donde la proteína terapéutica comprende una alfa-glucosidasa.

Modalidad 15. El método de una cualquiera de las modalidades 1-14, en donde la proteína terapéutica comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:13, o un fragmento de esta.

10 Modalidad 16. El método de una cualquiera de las modalidades 1-15, en donde la proteína terapéutica comprende un anticuerpo anti-ABeta, o anti-Tau.

Modalidad 17. El método de una cualquiera de las modalidades 1-16, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:11.

15 Modalidad 18. El método de una cualquiera de las modalidades 1-17, en donde el dominio enzimático comprende una alfa-glucosidasa, y en donde los niveles de glucógeno en cualquier tejido del CNS en el sujeto se reducen durante al menos nueve meses después del tratamiento.

Modalidad 19. El método de una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el sujeto tiene enfermedad de Pompe.

20 Modalidad 20. El método de una cualquiera de las modalidades 1-19, en donde la composición de nucleótido administrada proporciona un nivel en suero de proteína terapéutica multidominio de al menos 1 µg/ml.

Modalidad 21. Una proteína terapéutica multidominio comprende uno o más dominios de entrega y un dominio enzimático, en donde el uno o más dominios de entrega se unen al receptor de transferrina humana (hTfR).

25 Modalidad 22. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 21, que comprende

además un segundo dominio de entrega que se une a un efector de internalización.

Modalidad 23. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 22, en donde el segundo dominio de entrega se une a

(i) un efector de internalización seleccionado del grupo que consiste en CD63, Integrina alfa-7 (ITGA7), MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína-2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), proteína de mielina y linfocitos (MAL), IGF2R, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatona, receptores de leptina, receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, y CD36;

(ii) un efector de internalización expresado en varios tipos de tejido, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CD63, MHC-I, ATPasa H⁺ tipo vacuolar, IGF2R, Integrina alfa-7 (ITGA7), LRP5, LRP6, LRP8, Kremen-2, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, proteína 2 tipo proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR, MAL (proteína de mielina y linfocitos (MAL), receptores de toxina diftérica, HBEGF (factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina), receptores de glutatona, receptores de glutamato, receptores de leptina, y receptores de folato;

(iii) un efector de internalización expresado preferentemente en huesos y/o cartílagos, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en colágeno X, Integrina alfa 10 (ITGA10), receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), isoforma C del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3C), proteína 1 de enlace a proteoglicano y hialuronano (CRTL1), Agrecano, Colágeno II, y Kremen-1;

(iv) un efector de internalización preferentemente expresado en monocitos, macrófagos, o microglía, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en receptor depurador A1-5 (SCARA1-5), SCARB1-3, CD36, MSR1 (receptor depurador 1 de macrófagos), MRC1

(receptor 1 de manosa de macrófagos), VSIG4 (proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y V-set), CD68 (macrosialina), y CSF1R (receptor del factor 1 de estimulación de colonia de macrófagos);

(v) un efector de internalización expresado preferentemente en células renales, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Kloto), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de portadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), y UMOD (uromodulina). En otras modalidades determinadas, el efector de internalización es un internalizador específico del músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye);

(vi) un efector de internalización expresado preferentemente en células hepáticas, opcionalmente ASGR1 o ASGR2;

(vii) un efector de internalización preferentemente expresado en células musculares, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), m-cadherina, CD9, MuSK (quinasa específica del músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad de canal de calcio tipo L gamma-1), CACNAIS (subunidad de canal de calcio tipo L alfa-15), CACNG6 (subunidad

de canal de calcio tipo L gamma-6), SCN1B (subunidad de canal de sodio beta-1), CHRNA1 (subunidad de receptor de ACh alfa), CHRND (subunidad de receptor de ACh delta), LRRC14B (proteína 14B que contiene repeticiones rica en leucina), distroglicano (DAG1), y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye), o

- 5 (viii) una proteína de efector de internalización seleccionada del grupo que consiste en ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, MSR1, ASGR1, ASGR2, o PRLR.

Modalidad 24. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-23, en donde el segundo dominio de entrega se une al efector de internalización CD63.

- 10 Modalidad 25. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-24, en donde al menos uno del uno o más dominios de entrega comprende una proteína de unión a antígenos.

Modalidad 26. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 25, en donde cada uno del uno o más dominios de entrega comprende una proteína de unión a antígenos.

- 15 Modalidad 27. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-26, en donde al menos uno del uno o más dominios de entrega comprende un fragmento variable de cadena simple (scFv).

Modalidad 28. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-27, en donde al menos uno del uno o más dominios de entrega comprende un mediocuerpo.

- 20 Modalidad 29. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 28, en donde el dominio de entrega que se une a hTfR es un scFv, en donde el mediocuerpo se une a CD63, en donde el dominio enzimático es GAA, y en donde GAA se conjuga al extremo carboxi del mediocuerpo que se une a CD63.

- 25 Modalidad 30. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 27, en donde cada

uno del uno o más dominios de entrega comprende un scFv.

Modalidad 31. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 27-30, en donde al menos un scFv se fusiona a un Fc.

Modalidad 32. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 31, en donde el Fc comprende un isotipo de IgG4 humana de tipo silvestre, o derivado de este.

Modalidad 33. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 31-32, en donde GAA se conjuga al extremo carboxi del Fc.

Modalidad 34. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 30, que comprende un scFv anti-hTfR, un scFv anti-hCD63.

Modalidad 35. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 34, en donde tanto el scFv anti-hTfR como el scFv anti-hCD63 están unidos, en sus extremos carboxi, a una sola enzima GAA.

Modalidad 36. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-27, en donde el dominio de entrega es un scFv anti-hTfR, y el dominio enzimático se une al extremo carboxi del dominio VL del scFv.

Modalidad 37. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 36, que comprende además un segundo dominio de entrega unido al extremo N del dominio VH del scFv anti-hTfR.

Modalidad 38. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 37, en donde el segundo dominio de entrega es un scFv anti-hCD63.

Modalidad 39. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dominio enzimático comprende la secuencia de aminoácidos que se expone como la SEQ ID NO.:1

Modalidad 40. Un polinucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-39 o las modalidades 50-64.

Modalidad 41. El polinucleótido de la modalidad 40, que comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus.

Modalidad 42. El polinucleótido de la modalidad 40 o la modalidad 41, que comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de ácido nucleico de virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV).

Modalidad 43. El polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 40-42, que comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de ácido nucleico de virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV), y en donde la secuencia de ácido nucleico de AAV comprende una secuencia repetida de extremo interna, y opcionalmente, un elemento regulatorio específico del tejido tal como un promotor específico del hígado o un promotor específico neuronal.

Modalidad 44. El polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 40-43, que comprende además una secuencia de ácido nucleico de virus y una secuencia de ácido nucleico dirigida al locus, en donde la secuencia de ácido nucleico de virus es una secuencia de ácido nucleico de virus adeno-asociado (AAV) que comprende una secuencia repetida de extremo interna que comprende la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, o ambas, y opcionalmente, un elemento regulatorio específico del tejido tal como un promotor específico del hígado o un promotor específico neuronal.

Modalidad 45. El polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 40-44 que comprende además un elemento regulatorio específico del tejido que comprende la secuencia que se expone como SEQ ID NO:8 y/o SEQ ID NO:9.

Modalidad 46. Un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 40-45.

Modalidad 47. El vector de terapia génica de la modalidad 46, en donde el vector de terapia génica se selecciona del grupo que consiste en

un vector viral, opcionalmente en donde el vector viral es un virus natural, un virus modificado genéticamente, o un virus quimérico,

5 un polinucleótido desnudo que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 20-25,

un complejo de polinucleótidos, opcionalmente en donde el complejo de polinucleótidos es una nanopartícula lipídica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 20-25 y lípidos, y

10 cualquier combinación de estos.

Modalidad 48. El vector de terapia génica de la modalidad 46 o la modalidad 47, en donde el vector de terapia génica es un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un retrovirus, adenovirus, virus del herpes simple, poxvirus, vaccinia virus, lentivirus, o un virus adeno-asociado.

15 Modalidad 49. El vector de terapia génica de la modalidad 47 o la modalidad 48, en donde el vector de terapia génica es AAV9, Anc80, una quimera AAV2/8 y/o un AAV pseudotipado a un tejido específico, p. ej., el tejido hepático o neuronal.

Modalidad 50. Una proteína terapéutica multidominio que comprende al menos dos dominios de entrega y al menos un dominio enzimático, en donde cada uno de los dos dominios de entrega se selecciona independientemente del grupo que consiste en un anticuerpo, un mediocuerpo, y un scFv, y en donde al menos uno o más de los dominios de entrega se asocia al menos con un dominio enzimático, preferentemente en donde el uno o más dominios de entrega se unen covalentemente al menos a un dominio enzimático.

25 Modalidad 51. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 50, que comprende no más de dos dominios de entrega.

Modalidad 52. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 50 o la modalidad 51, en donde solo uno de los dominios de entrega se asocia con el al menos un dominio enzimático.

Modalidad 53. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 50-52, en donde cada uno de los al menos dos dominios de entrega se une covalentemente a un dominio enzimático.

Modalidad 54. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 53, en donde cada uno de los al menos dos dominios de entrega se une covalentemente al mismo dominio enzimático.

Modalidad 55. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 53, en donde cada uno de los al menos dos dominios de entrega se une covalentemente a un dominio enzimático diferente.

Modalidad 56. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 50-55, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende no más de dos dominios de entrega, en donde el primer dominio de entrega comprende un mediocuerpo, y en donde el segundo dominio de entrega comprende un scFv.

Modalidad 57. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 56, en donde el scFv se fusiona a un Fc.

Modalidad 58. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 56 o la modalidad 57, en donde el mediocuerpo se une covalentemente en su extremo carboxi a un primer dominio enzimático y/o en donde el scFv se une covalentemente en su extremo carboxi a un Fc, y opcionalmente, un segundo dominio enzimático.

Modalidad 59. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 50-55, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende no más de dos dominios de entrega, en donde el primer y el segundo dominios de entrega comprenden

cada uno un scFv.

Modalidad 60. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 59, en donde tanto el primer como el segundo scFv se unen covalentemente a un dominio enzimático.

Modalidad 61. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 59, que comprende desde el extremo N al extremo C: el primer scFv, el segundo scFv, y el dominio enzimático.

Modalidad 62. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 50-61, en donde al menos un dominio de entrega se une a una molécula de tráfico lisosómico y al menos un dominio de entrega se une a un efector de transcitosis.

Modalidad 63. La proteína terapéutica multidominio de la modalidad 62, en donde la molécula de tráfico lisosómico se selecciona del grupo que consiste en CD63, ITGA7, CD9, CD63, CD81, CD82, o CD151, y en donde el efector de transcitosis se selecciona del grupo que consiste en un receptor de LDL, un receptor de IgA, un receptor de transferrina, un receptor de Fc neonatal, receptor de insulina, CD98, y Basigina.

Modalidad 64. La proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 50-63, que comprende una estructura como se ilustra en la Figura 1C, la Figura 1D, la Figura 1E, o la Figura 1F.

Modalidad 65. Uso de un nucleótido que codifica la proteína terapéutica multidominio de una cualquiera de las modalidades 21-39 y 50-64, el polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 40-45, o el vector de terapia génica de una cualquiera de las modalidades 46-49 en el método de una cualquiera de las modalidades 1-20.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente los métodos de la presente invención. Estos ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de polinucleótido scFv::GAA anti-hCD63 y vector de terapia génica

Los virus AAV2/8 que codifican la expresión de GAA humana (hGAA; SEQ ID NO: 1; secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO:12) o un fragmento variable de cadena simple (ScFv) anti-CD63 humano fusionado en su extremo C a GAA humana (ScFv-hGAA anti-hCD63; SEQ ID NO: 10; ácido nucleico representado por la SEQ ID NO:11) se generaron usando un protocolo de transfección triple estándar (Gray et al. 2011; véase también “Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use *in vitro* and *in vivo* administration”, Current Protocols in Neuroscience, John Wiley & Sons, New York (1999), págs. 4.17.1–4.17.25, Vol 1). Para la producción, se colocaron 1×10^7 células HEK293 en placas de 15 cm. Al día siguiente se transfectaron las células con (A) ya sea 8 μ g de un vector de pAAV de control que comprende un potenciador de serpin 1 específica del hígado (SEQ ID NO:9) y que codifica GAA humana impulsada por TTR o pAAV de prueba que comprende un potenciador de serpin 1 específica del hígado (SEQ ID NO:9) y que codifica un ScFv-hGAA hCD63 impulsado por TTR (véase la **Figura 1B**) y (B) un vector derivado de RC2/8 pAAV (Gao, 2002) y 16 μ g de pHelper (Agilent, Cat #240074) usando transfección mediada por PEIpro (Polyplus transfection, Nueva York, NY catálogo# 115-100) en una relación de 1:1 (1 μ l PEIpro : 1 μ g ADN). Setenta y dos horas después de la transfección, se recolectaron las células y se lisaron en un amortiguador compuesto por 20 mM de Tris-HCl, 1mM de MgCl₂, 2.5 mM de KCl, 100 mM de NaCl usando un método de congelamiento-descongelamiento estándar. A continuación, se añadió benzonasa (Sigma, Cat# E1014-25KU) a las muestras a una concentración final de 0.5 U/ μ L, y después se incubó esto a 37 °C por 60 minutos. Después se purificaron los virus mediante el uso de ultracentrifugación de gradiente de yodixanol como se describe en (Zolotukhin et al., 1999, Gene Ther 1999;6:973–985) y posteriormente se titularon por qPCR. Las muestras de AAV se trataron con DNaseI (ThermoFisher Scientific, Cat #EN0525) a 37 °C

durante una hora y se lisaron mediante el uso de DNA Extract All Reagents (Thermofisher Scientific Cat# 4403319). Los genomas virales encapsidados se cuantificaron mediante el uso de un sistema QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermofisher Scientific) mediante el uso de cebadores dirigidos a las ITR de AAV2. Las secuencias de los cebadores de ITR de AAV2 son 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (fwd ITR; SEQ ID NO:3) y 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (rev ITR; SEQ ID NO:4) (Aurnhammer *et al.*, 2012), derivaron la secuencia de repetición invertida interna izquierda (ITR) del AAV (SEQ ID NO:6) y la secuencia de repetición invertida interna derecha (ITR) del AAV (SEQ ID NO:7), respectivamente. La secuencia de la sonda de ITR de AAV2 es 5'-6-FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO:5) (Aurnhammer C., Haase M., Muether N., et al., 2012, Hum. Gene Ther. Methods 23, 18–28). Después de una etapa de activación de 95 °C durante 10 min, se realizó un ciclo de PCR de dos etapas a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos por 40 ciclos. Se usó la mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermofisher Scientific, Cat #4304437) en la qPCR. Se usó el plásmido de ADN (Agilent, Cat #240074) como estándar para determinar los títulos absolutos.

Los anticuerpos anti-CD63 humano y sus fusiones usaron los dominios variables anti-CD63 humano de ratón H5C6 (aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO.:10 proporcionan la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (V_H) del anticuerpo H5C6 y los aminoácidos 135-245 de la SEQ ID NO.:10 proporcionan la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo H5C6). El scFv anti-hCD63 usado aquí (SEQ ID NO.:2) se derivó del clon de H5C6, que es IgG1 monoclonal anti-hCD63 de ratón , anticuerpo de cadena ligera kappa (H5C6 se depositó en el Developmental Studies Hybridoma Bank (Banco de Hibridomas de Estudios de Desarrollo) en la Universidad de Iowa en agosto, J.T. / Hildreth, J.E.K. (DSHB Hybridoma Product H5C6; DSHB Cat# h5c6, RRID:AB 528158).

Las versiones de scFv de los anticuerpos se clonaron con dominios variables en orden de

pesado a ligero con un enlazador de glicina-serina en el medio (5'-VH-Gly-Ser-VL-3')

Ejemplo 2: Contenido de glucógeno en el modelo de Pompe murino después de AAV

Para determinar el efecto de la fusión de ScFv-GAA anti-hCD63 entregado por AAV contra GAA
 5 entregado por AAV, en un modelo *in vivo* de almacenamiento de glucógeno relevante, ambas
 terapias se entregaron a un modelo de ratón con enfermedad de Pompe donde los ratones eran
 homocigotos para la delección del gen GAA de ratón y eran homocigotos para la expresión de
 CD63 humano en lugar de CD63 de ratón con un fondo de cepa de 75 % C57BL/6; 25 %
 129SvJ. Estos ratones se denominan en la presente descripción ratones KO GAA HumIn CD63
 10 o alternatively ratones GAA^{-/-} CD63hu/hu.

Para el experimento, se administró a los ratones KO GAA HumIn CD63 de 2 meses de edad
 mediante inyección en la vena de la cola ya sea un virus AAV2/8 que contiene un genoma con
 ya sea la GAA humana que impulsa los promotores específicos del hígado TTR (AAV-hGAA;
 descrita en el Ejemplo 1) o el ScFv anti CD63 humano que impulsa promotores específicos del
 15 hígado TTR fusionado en su extremo C con GAA humana (ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63;
 descrito en el Ejemplo 1). Se entregó ambos virus AAV2/8 a una cualquiera de dos dosis, 1e10
 vg/ratón o 1e11 vg/ratón. Como controles, se incluyeron en el ensayo ratones KO GAA HumIn
 CD63 sin tratar y HumIn CD63 sin tratar con el gen GAA de ratón intacto. Los ratones se
 alojaron durante 3 meses después del tratamiento y se les extrajo sangre en incrementos
 20 (mensualmente) durante este período para mediciones de suero de los niveles de GAA y
 anticuerpos anti-GAA. Después de 3 meses, todos los ratones fueron sacrificados y se
 cosecharon tejidos individuales para mediciones de glucógeno, tinción con PAS-H,
 cuantificación de núcleos centrales, medición de la proliferación lisosómica, y medición de la
 expresión de LC3b. En la Tabla 3 se muestra el protocolo de tratamiento y dosificación
 25 experimental para los grupos de ratones.

Tabla 3: Protocolo de tratamiento y dosificación experimental para los grupos de ratones

Grupo	Ratones	Cantidad de ratones	Tratamiento	Dosificación
1	KO GAA HumIn CD63	4	Nada	N/C
2	KO GAA HumIn CD63	4	AAV-hGAA	1e10 vg/ratón
3	KO GAA HumIn CD63	4	AAV-hGAA	1e11 vg/ratón
4	KO GAA HumIn CD63	5	ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63	1e10 vg/ratón
5	KO GAA HumIn CD63	4	ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63	1e11 vg/ratón
6	WT GAA HumIn CD63	2	Nada	N/C

Los resultados también se ilustran en la Figura 2, que muestra que anti-hCD63scFv::GAA

- 5 disminuye el glucógeno a niveles de tipo silvestre en los músculos esqueléticos, a diferencia de la GAA sola. El tratamiento con la proteína terapéutica multidominio anti-hCD63scFv::GAA de dos dominios dio como resultado una reducción mucho mayor en el glucógeno almacenado en comparación con la enzima de reemplazo de GAA de dominio único. Al graficar los niveles de glucógeno en cuádriceps (Figura 3) o los niveles de glucógeno en el corazón (Figura 4) contra
- 10 la expresión total en suero de GAA o scfv-GAA durante tres meses para cada ratón individual, se observó que la proteína de fusión anti-hCD63scFv::GAA elimina más glucógeno que la enzima GAA sola, incluso en niveles en suero similares (Figuras 3 y 4).

Ejemplo 3: Respuesta inmunológica a GAA

- Para medir los niveles en suero de anticuerpo anti-GAA humana, el suero de todos los grupos
- 15 de tratamiento se separó de la sangre recolectada durante la extracción de sangre terminal mediante el uso de tubos separadores de suero (BD Biosciences, Cat#365967) de acuerdo con

las especificaciones del fabricante. Por separado, las placas de alta unión a proteínas de 96 pocillos (ThermoFisher, Cat#15041) se recubrieron con 20µg de hGAA (R&D Systems, Cat#8329-GH-025) diluida en PBS durante toda la noche. Las placas se lavaron con PBS + Tween al 0.05 % (PBS-T) 3 veces. Las placas se bloquearon con BSA al 0.5 % en PBS-T, y se

5 añadieron diluciones en serie de suero de ratón que variaban de 1:300 a 1:5.1e7 a la placa durante toda la noche. Se midió la anti IgG de ratón (subclases 1 + 2a + 2b + 3) mediante el uso de un anticuerpo anti igG de ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson Immuno Research, Cat# 115-035-164) y el kit de sustrato BD OptEIA. Las reacciones colorimétricas se detuvieron mediante el uso de 1 N de ácido fosfórico. Después se leyó la absorbancia a 450 nm en un

10 lector de placas Spectramax i3 (Molecular Devices). Las curvas de dilución se ajustaron a curvas sigmoidales, y los títulos se calcularon a partir de las curvas. Los títulos expresados como el título de IgG total promedio +/- DS se muestran en la Tabla 4.

Como se muestra en la Tabla 4, los ratones que no recibieron tratamiento mostraron un título de fondo promedio con niveles medios de 1.1E+03. Los ratones tratados con la dosis baja de virus

15 (1e10 vg/ratón) de ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 o AAV-hGAA demostraron altos títulos, mientras que en los ratones tratados con la dosis alta (1e11 vg/ratón), los títulos fueron menores. Los ratones tratados con 1e11vg de ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 que tenían los mayores niveles de GAA en suero tuvieron títulos dentro del rango de los ratones sin tratar.

Tabla 4: Niveles de anticuerpos anti-GAA en suero

	Título de anti-GAA de IgG total				
	KO GAA HumIn CD63 + sin tratamiento	KO GAA HumIn CD63 + AAV-	KO GAA HumIn CD63 + AAV-hGAA (1e11vg)	KO GAA HumIn CD63 + ScFv-hGAA AAV-anti-	KO GAA HumIn CD63 + ScFv-hGAA AAV-anti-

		hGAA (1e10vg)		hCD63 (1e10vg)	hCD63 (1e11vg)
Promedio	1.1E+03	7.6E+06	2.4E+04	5.5E+04	4.0E+03
DS	1.3E+03	1.0E+07	2.5E+04	1.9E+04	4.9E+03

Los niveles superiores de GAA o anti-hCD63scFv::GAA después de la administración de AAV corresponden con títulos de anti-GAA inferiores. Se evaluó el suero de ratones nulos en GAA tratados con títulos altos o bajos de AAV-anti-hCD63scFv::GAA o AAV-GAA en busca de

- 5 anticuerpos anti-GAA en el transcurso de los tres meses después de la inyección. La **Figura 5** ilustra los títulos de anticuerpos anti-GAA en suero contra la exposición a GAA (es decir, la expresión total en suero durante 3 meses de GAA o scfv-GAA) de ratones individuales, que presenta una correlación negativa entre el título de anticuerpo y la exposición de suero a GAA, lo que demuestra que los ratones con alta exposición a GAA desarrollaron tolerancia a la GAA.
- 10 Igualmente, la **Figura 6**, que grafica títulos de anticuerpos anti-GAA de varios grupos infectados con AAV que codifica GAA o una proteína anti-hCD63scFv::GAA, demuestra que las dosis mayores de construcción llevaron a títulos menores de anti-GAA.

Ejemplo 4: GAA de suero

- Para medir los niveles en suero de GAA humana en el transcurso del experimento, se
- 15 recolectaron muestras en puntos en el tiempo tiempo mensuales por medio de sangrado de cola. El suero se separó de la sangre mediante el uso de tubos separadores de suero (BD Biosciences, Cat# 365967) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 1 µl de suero aislado se cargó después en un gel premoldeado wedgewell de Novex al 4-20 %, se ejecutó a 220 V durante 45 minutos y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 200 mA durante 1
- 20 hora mediante el uso de procedimientos estándar. La membrana de nitrocelulosa se sondeó

después con un anticuerpo primario anti-GAA (Abcam, #ab137068) usado a una dilución de 1:2000 y un anticuerpo anti-GAPDH (Abcam, #AB9484) usado a una dilución de 1:1000 en 12 ml y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Después de la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con 1 x TBST durante 5 minutos por lavado. Después se añadieron anticuerpos secundarios anti IgG de conejo (LiCor, 926-32211) y anti IgG de ratón (LiCor, 925-68070) (LiCor, Lincoln, NE) a una dilución de 1:15000 en 12 ml a la membrana y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de anticuerpos secundarios, la membrana se lavó dos veces con 1 x TBST durante 5 minutos por lavado y una vez con 1 x TBS durante 5 minutos. Después, la membrana se capturó en imagen y se cuantificó mediante el uso de un instrumento LiCor Odyssey (LI-COR Biotechnology). Los niveles en suero de GAA expresados como desviación estándar (DS) +/- media en unidades arbitrarias se muestran en la Tabla 5.

Como se muestra en la Tabla 5, los ratones KO GAA HumIn CD63 tratados con la dosis alta (10^{11} vg/ratón) de ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 o AAV-hGAA demostraron niveles sostenidos de GAA en el suero en el transcurso del experimento, con niveles en suero de GAA algo más altos en ratones tratados con ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 que en los ratones tratados con AAV-hGAA. En los ratones tratados con la dosis baja (10^{10} vg/ratón) de ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 o AAV-hGAA, los niveles de GAA cayeron en el transcurso del experimento, aproximándose a niveles insignificantes en algunos ratones en el punto de tiempo de la semana 12.

Tabla 5: Niveles de GAA en suero

Semana	ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 (10^{10} vg)		AAV-hGAA (10^{10} vg)		ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 (10^{11} vg)		AAV-hGAA (10^{11} vg)	
	Promedi	DS	Promedi	DS	Promedi	DS	Promedi	DS

	o		o		o		o	
1	0.21	0.17	0.04	0.03	2.36	1.78	0.77	0.53
2	0.19	0.16	0.07	0.07	2.02	1.18	1.15	0.56
4	0.17	0.15	0.01	0.02	2.80	1.16	1.22	0.75
8	0.29	0.33	0.03	0.05	2.58	1.18	0.62	0.60
12	0.12	0.19	0.00	0.01	2.61	1.53	0.77	0.86
Área bajo la curva	2.27	2.23	0.27	0.36	28.13	13.73	9.80	7.22

La expresión de GAA o anti-hCD63scfv::GAA se mantuvo en el tiempo en ratones que recibieron la dosis alta de AAV (10^{11} vg/ratón), pero disminuyó en ratones que recibieron la dosis menor (10^{10} vg/ratón). La Figura 7A ilustra un gráfico que representa los niveles en suero de GAA, según se sondearon mediante western blot, en el transcurso del tiempo de diversos grupos infectados con AAV que codifica GAA o una fusión de scfv anti-hCD63 a GAA. La proteína de fusión (scFv::GAA) demostró niveles consistentemente mayores (p. ej., de 2.5 a 3 veces) de GAA en suero que la enzima de GAA sin el dominio de entrega (Figura 7A).

Las cuantificaciones de PCR en tiempo real de la expresión de lisados en el hígado, el corazón y el cuádriceps 3 meses después de la inyección se muestran en la Figura 7B. Se detectó la expresión en el hígado de todas las inyecciones de construcción de AAV, con los niveles más altos de las inyecciones de $1e11$ vg/ratón tanto para AAV-hGAA como para AAV-anti-hCD63::hGAA (ambas impulsadas por el promotor específico del hígado, LSP). También se realizó una comparación del nivel de GAA en suero con el nivel de expresión de ARN de GAA (Figura 7C) y los resultados muestran que los ratones que recibieron el AAV que codifica la proteína de fusión presentaron menor expresión de ARN de GAA localizada en el hígado a los 3 meses, sin embargo, los niveles de suero de GAA fueron altos en ese ratón particular. Las

inyecciones de AAV-LSP-hGAA no presentaron altos niveles en suero de GAA cuando los niveles de ARN eran bajos en el hígado. Véase la Figura 7C. Estos datos sugieren que el AAV que codifica la proteína de fusión (y la expresión es impulsada por un promotor específico del hígado) obtiene un perfil de secreción mejorado de GAA.

- 5 También se observó una mayor relación de secretado con respecto a intracelular de anticuerpo::hGAA frente a hGAA solo en hepatocitos Huh-7. En un experimento, los hepatocitos humanos Huh-7 se transfectaron transitoriamente con construcciones impulsadas por el promotor específico del hígado que codifican hGAA, fusión de scFv::GAA anti-hCD63, o un control de scFv::GAA sin unión. Ambas construcciones de fusión scFv::GAA tuvieron una
- 10 relación superior de proteína en el sobrenadante secretado que la hGAA sola 3 días después de la transfección (estadísticamente significativo para $p < 0.05$, $n=3$). La adición de M6P en el sobrenadante durante el período experimental para mitigar la absorción mediada por CI-MPR no afectó la relación.

Ejemplo 5: Medición tisular de glucógeno y caracterización histológica del tejido muscular

- 15 **Mediciones tisulares de glucógeno:** Para medir el contenido de glucógeno en tejidos individuales, se disecaron tejidos del corazón, el cuádriceps, el gastrocnemio, el diafragma, el sóleo y el EDL de ratones de todos los grupos inmediatamente después de asfixia con CO_2 y luego se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Se lisaron ~50 mg de cada tejido en un homogeneizador de mesa con perlas de acero inoxidable
- 20 en agua destilada en una relación de 1 mg a 25 μl de agua para mediciones de glucógeno. Los lisados de análisis de glucógeno se calentaron a 105° durante 15 minutos y se centrifugaron a $21000 \times g$ para limpiar los desechos. Las mediciones de glucógeno se realizaron mediante el uso de un kit de ensayo de glucógeno (Sigma-Aldrich, #MAK016) de acuerdo con las
- 25 instrucciones del fabricante para los ensayos fluorométricos. La fluorescencia de cada muestra se midió a 535 nm de excitación y 587 nm de emisión en un lector de placas de fluorescencia

(Molecular Devices, Spectramax i3). La cantidad calculada de glucógeno se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula proporcionada por el fabricante. La cantidad calculada de glucógeno de cada tejido en cada grupo de tratamiento se promedió después y se expresó como desviación estándar (DS) +/- media en la Tabla 6.

- 5 Como se muestra en la Tabla 6, la pérdida de GAA causa un gran aumento en los niveles promedio de glucógeno en todos los tejidos medidos, en comparación con los ratones WT GAA. El tratamiento con ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 a 10^{11} vg/ratón redujo el glucógeno a niveles WT o casi WT en todos los tejidos probados, a diferencia del tratamiento con AAV-GAA que solo redujo parcialmente el glucógeno almacenado. Las dosis bajas de cualquiera de los virus
- 10 también redujeron el glucógeno, pero en menor medida que las dosis altas. La dosis de 10^{10} vg/ratón de ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 redujo los niveles de glucógeno en una manera similar a la dosis de 10^{11} vg/ratón de AAV-GAA.

Tabla 6: Nivel de glucógeno de DS +/- media medido en corazón, cuádriceps, gastrocnemio, diafragma, sóleo y EDL

	sin tratamiento		AAV-hGAA (10^{10} vg)		AAV-hGAA (10^{11} vg)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
Corazón	27.798	3.013	17.246	4.375	1.770	2.279
Cuádriceps	14.650	1.783	11.012	0.528	5.878	3.504
Gastrocnemio	14.295	0.480	10.990	0.868	6.073	3.080
Diafragma	15.463	1.173	11.446	1.237	3.995	3.395
Sóleo	17.260	2.262	13.684	2.506	6.533	5.201
EDL	13.588	0.498	11.178	1.760	6.275	3.159

	ScFv-hGAA AAV- anti-hCD63 (10^{10} vg)		ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 (10^{11} vg)		Ratones WT GAA HumIn CD63 (control)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
Corazón	2.190	2.678	0.058	0.010	0.085	0.007
Cuádriceps	4.485	3.147	0.798	0.251	0.440	0.042
Gastrocnemio	5.198	2.516	0.825	0.461	0.790	0.014
Diafragma	3.083	2.968	0.388	0.121	0.385	0.007
Sóleo	5.268	2.786	1.040	0.896	0.545	0.049
EDL	2.495	1.750	0.313	0.099	0.260	0.141

Cosecha de cuádriceps para la histopatología y cuantificación: Las muestras de tejido de cuádriceps de ratones de cada grupo aparte del grupo de tratamiento de dosis baja ($1e10$ vg/ratón) se congelaron instantáneamente inmediatamente después de la disección en

5 nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para la cuantificación de la expresión de LC3b o se colocaron en bloques que contenían medio O.C.T (Tissue-Tek, #4583).

Las muestras de tejidos en medio O.C.T se enviaron a Histoserv, Inc. (Germantown, MD) para el seccionamiento y el tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés) para detectar polisacáridos. Se prepararon secciones adicionales y se devolvieron para la tinción de

10 núcleos centrales y proliferación lisosómica.

Tinción con PAS: Las secciones de tinción con PAS se capturaron en imagen mediante el uso de un escáner para portaobjetos Leica a un aumento de 20x. Las imágenes resultantes de ratones representativos de cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 8.

Como se muestra en la Figura 8, los KO GAA HumIn CD63 que se trataron con ScFv-hGAA

15 AAV-anti-hCD63 a los 3 meses demostraron una marcada disminución en la tinción en

comparación tanto con los ratones KO GAA HumIn CD63 sin tratamiento y los ratones KO GAA HumIn CD63 tratados con AAV-hGAA, que mostraron altos niveles de tinción con PAS. Esto indica además que el tratamiento con ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 puede reducir la acumulación de polisacáridos en ratones KO GAA HumIn CD63 y puede hacerlo de una manera uniforme a través de las fibras musculares.

Cuantificación de núcleos centrales y proliferación lisosómica: Las secciones no teñidas de Histoserv se retiraron del congelador y luego se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos en una cámara de tinción. Después se lavaron los portaobjetos fijos dos veces durante 5 minutos en PBS y posteriormente se incubaron con amortiguador de bloqueo (eBiosciences, 00-4953-54) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo anti-Lamp-1 de rata (Abcam, #AB25245) a una dilución de 1:50 en amortiguador de bloqueo, un anticuerpo anti-Laminina de conejo (Sigma, #L9393) en una dilución de 1:1000 en amortiguador de bloqueo o amortiguador de bloqueo sin anticuerpo añadido mientras estaban en una cámara de tinción humidificada y después se transfirieron a 4 °C para la incubación durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron los portaobjetos dos veces durante 5 minutos en PBS y posteriormente se tiñeron con anticuerpo secundario superclonal anti IgG de conejo (H+L) de cabra conjugado con Alexa Fluor 647 (Life Tech Thermo, #A27040) o anticuerpo secundario adsorbido de manera cruzada anti IgG de rata (H+L) de cabra conjugado con Alexa Fluor 555 (Life Tech Thermo, #A21434) en una cámara de tinción, y después se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavaron los portaobjetos teñidos dos veces durante 5 minutos en PBS antes de montarse con Fluoromount-G con DAPI (Life Tech Thermo, #00-4959-52) y se capturaron en imagen en un instrumento Zeiss LSM710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). La cantidad de núcleos centralizados se cuantificó mediante el uso del software Halo (Indica Labs, NM) y se expresa como porcentaje de fibras que muestran núcleos centrales +/- desviación estándar, se muestra en la Tabla 7. La

proliferación lisosómica se ilustra en la Figura 8.

Tabla 7: Cuantificación de núcleos centrales

	sin tratamiento		AAV-hGAA (1e11vg)		ScFv-hGAA AAV-anti- hCD63 (1e11vg)		Ratones WT GAA HumIn CD63 (control)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
% de fibra con núcleos centrales	22.00	10.10	33.00	4.36	12.75	6.29	8.50	7.78

Cuantificación de la expresión de LC3b: Para la cuantificación de la expresión de LC3b, las

- 5 muestras congeladas instantáneamente se descongelaron, se homogeneizaron y después se lisaron en amortiguador de RIPA a una relación de 1 mg de tejido a 25 µl de amortiguador de RIPA (150 mM de NaCl, 1.0 % de IGEPAL® CA-630, 0.5 % de desoxicolato de sodio, 0.1 % de SDS, 50 mM de Tris, pH 8.0, Sigma Aldrich, R0278) mediante un impacto de perla durante 45 segundos (MP Biomedical). Se eliminaron los materiales insolubles de los lisados mediante
- 10 centrifugación a 21,000 x g y después se cargaron 300 µg de lisado en amortiguador de RIPA en un gel premoldeado wedgewell Novex al 4-20 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron por medio de western blot mediante el uso de un protocolo similar como se describió anteriormente para el análisis de los niveles de GAA en suero, sustituyendo el uso de un anticuerpo primario que reconoce LC3b-I y LC3b-II de ratón (Sigma, #L7543) en
- 15 lugar del anticuerpo primario contra GAA. Después, la membrana se capturó en imagen y se

cuantificó mediante el uso de un instrumento LiCor Odyssey (LI-COR Biotechnology). Los niveles de LC3b-I y LC3b-II expresados como (desviación estándar +/- media) en unidades arbitrarias se muestran en la Tabla 8.

Como se muestra en la Tabla 8, hubo un aumento significativo en los niveles promedio de

- 5 LC3b-I y de LC3b-II en los ratones que carecían de GAA en comparación con los ratones WT GAA HumIn CD63. El tratamiento con ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63 disminuyó los niveles de LC3b-I y LC3b-II en KO GAA HumIn CD63 a los niveles WT o cerca de WT. Los KO GAA HumIn CD63 tratados con AAV-hGAA demostraron niveles promedio de LC3b-I y LC3b-II ligeramente menores en comparación con los ratones KO GAA HumIn CD63, pero esta
- 10 disminución no fue tan pronunciada como con el tratamiento con ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63.

Tabla 8: Niveles de LC3b-I y LC3b-II en los cuádriceps de ratones

Niveles de LC3b-I (unidades arbitrarias)				
tratamiento	sin tratar	AAV-hGAA	ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63	WT GAA HumIn CD63 (control)
promedio	833	628	403	282
DS	109	139	33	49
Niveles de LC3b-II (unidades arbitrarias)				
tratamiento	sin tratar	AAV-hGAA	ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63	WT GAA HumIn CD63 (control)
promedio	3308	2888	445	369
DS	582	1282	398	33

Ejemplo 6: El tratamiento con anti-hCD63::GAA de AAV conduce a ganancias significativas en las pruebas de fuerza y coordinación muscular

- 15 La fuerza de agarre y el rendimiento de la prueba de Rotarod de ratones tratados (véase

anteriormente) con AAV-LSP hGAA o AAV-LSP anti-hCD63::hGAA. Las mediciones de Rotarod de aceleración (Figura 9A) y las mediciones de la fuerza de agarre de la extremidad anterior (Figura 9B) de ratones GAA de tipo silvestre, control no tratado, tratamiento con AAV-LSP-hGAA (1e11vg/ratón) o tratamiento con AAV-LSP-anti-hCD63::hGAA (1e11vg/ratón) se tomaron en intervalos mensuales durante 6 meses. Las barras de error son +/- desviación estándar. N=8-10 para todos los grupos.

Ejemplo 7: Otras proteínas de membrana como “guías” que dirigen GAA a tejidos

Se probaron otras proteínas de membrana, tales como proteínas de fusión anti-ITGA7 (Integrina alfa-7), para guiar GAA a tejidos para reemplazar GAA en ratones deficientes en enzimas. Los mioblastos de ratón C2C12 se incubaron durante toda la noche con anti-mCD63-GAA o anti-ITGA7-GAA con o sin la presencia de 5 mM de M6P. La enzima de GAA activa se detectó en los lisados de mioblastos con el tiempo en ambas proteínas de fusión (Figura 10A). En experimentos adicionales, a los ratones GAA KO humanizados para CD63 (GAA^{-/-};CD63^{hu/hu}) se les proporcionó plásmidos que codifican un formato de scFv::GAA de anti-hCD63::GAA o un formato de IgG4::GAA de longitud completa de anti integrina alfa-7 mediante entrega hidrodinámica (HDD), y se sacrificaron los ratones 3 semanas después de la HDD. Se midieron los niveles de glucógeno en tejidos en el corazón, cuádriceps, gastrocnemio y diafragma. También se probaron ratones de control no tratados, GAA^{-/-}xCD63^{hu/hu} y ratones de control de GAA de tipo silvestre sin tratar, GAA^{+/+};CD63^{hu/hu} (4) en las mismas condiciones. Los niveles de glucógeno se encontraron en niveles muy bajos en los grupos de ratones tratados con anti-hCD63::GAA y los grupos de ratones tratados con anti-ITGA7::GAA, como en los ratones de tipo silvestre. Véase la Figura 10B.

Ejemplo 8: En niveles en suero comparables, el tratamiento con anti-CD63::GAA de AAV es más eficaz que el AAV con construcción de GAA optimizada

Los ratones KO GAA HumIn CD63 (GAA^{-/-} x CD63^{hu/hu}) infectados con AVV que contienen un

potenciador específico del hígado (serpina 1; SEQ ID NO:9) y un promotor específico del hígado (LSP; TTR; SEQ ID NO:8) que impulsan la expresión de una proteína terapéutica multidominio anti-hCD63::GAA (SEQ ID NO.:10), que usa un péptido de señal B2 quimiotripsinógeno (SP7) y contienen aminoácidos 36-952 de GAA humana (Δ 8GAA) exhibieron ganancias significativas en las pruebas de fuerza y coordinación muscular. Se proporcionaron tres dosis diferentes para cada virus: 5e11 vg/kg, 2e12 vg/kg, y 4e12 vg/kg. El suero se recolectó por medio de extracción de sangre submandibular de manera regular. Un mes después de la infección con AAV, se sacrificaron los ratones. Las muestras de tejido muscular cardíaco y esquelético se recolectaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C para su almacenamiento. Se midió el glucógeno en los tejidos mediante la homogeneización de tejidos por el impacto de perla en agua destilada. Las muestras se hirvieron y se centrifugaron, y los sobrenadantes se usaron en un kit de ensayo de glucógeno comercial. El suero se cuantificó mediante el uso de western blot con un anticuerpo contra GAA humana como se describe en ejemplos anteriores. Para cada ratón, el nivel de glucógeno en cada tejido se graficó contra el nivel en suero de la construcción al 1 mes. Se usaron ajustes de curva de 4 parámetros para determinar el EC50 de los dos tratamientos en cada tejido.

La infección con AVV que contenían un promotor específico del hígado (LSP) que codifica anti-hCD63::GAA o sp7- Δ 8GAA proporcionó niveles en suero comparables de GAA en cada dosis de infección. **Figura 11.** Sin embargo, en cada tejido muscular analizado, se observó una reducción de ~2.2 veces en EC50 cuando se usó anti-hCD63::GAA vs. sp7- Δ 8GAA, lo que demuestra que a niveles en suero equivalentes, anti-CD63::GAA elimina el glucógeno más eficazmente que una construcción de expresión de GAA modificada que no se fusiona con un anticuerpo. **Véase la Figura 12.**

Ejemplo 9: Contenido de glucógeno en CNS del modelo de Pompe murino después

del tratamiento con AAV con diversas construcciones y dosis de GAA

Se administró a los ratones KO GAA HumIn CD63 de 2 meses de edad mediante inyección en la vena de la cola ya sea un virus AAV2/8 que contiene un genoma con ya sea la GAA humana que impulsa los promotores específicos del hígado TTR (AAV-hGAA; descrita en el Ejemplo 1) o el ScFv anti CD63 humano que impulsa promotores específicos del hígado TTR fusionado en su extremo C con GAA humana (ScFv-hGAA AAV-anti-hCD63; descrito en el Ejemplo 1). Ambos virus AAV2/8 se entregaron a $1e11$ vg/ratón. Como controles, se incluyeron en el ensayo ratones KO GAA HumIn CD63 sin tratar ($Gaa^{-/-}$) y HumIn CD63 sin tratar con el gen GAA de ratón intacto (ratones de tipo silvestre). Los ratones se alojaron durante 9 meses después del tratamiento, después de lo cual todos los ratones se sacrificaron y los tejidos individuales se cosecharon para mediciones de glucógeno. Los tejidos del CNS se diseccionaron en hielo y se congelaron rápidamente 9 meses después de la transducción de AAV. Los tejidos de médula espinal, cerebelo e hipocampo se homogeneizaron en agua desionizada destilada usando impacto de perla, y el glucógeno se midió en los sobrenadantes de lisado tisular mediante el uso de un kit de ensayo de glucógeno fluorométrico comercial (**Figura 13**).

En otro experimento análogo, los ratones con genes inactivados se trataron con construcciones de AAV que codifican GAA ($1e11$ vg) o fusión anti-CD63ScFv-GAA (dosis de $1e10$ vg, $5e10$ vg, o $1e11$ vg). Se examinaron los ratones de tipo silvestre y la cantidad de glucógeno almacenado por mg de tejido del CNS (médula espinal: **Figura 14A** cerebro: **Figura 14B**) 3 meses después de la entrega de AAV. Los ratones de tipo silvestre y los ratones KO ($GAA^{-/-}$) que estaban sin tratar se usaron como comparadores por sus niveles de glucógeno almacenado en el tejido del CNS durante la misma duración (3 meses).

Las construcciones de fusión ScFv-GAA fueron más eficaces que GAA sola para reducir los niveles de glucógeno almacenado en ratones enfermos a una dosis de $1e11$ vg/ratón (**Figuras 13-14**). Una dosis de $5e10$ vg de fusión de ScFv-GAA proporcionó niveles de almacenamiento

de glucógeno reducidos equivalentes a la construcción sola de GAA de mayor dosis (**Figuras 14A-14B**). Se demostró que estos niveles de almacenamiento de glucógeno reducido son eficaces en Hordeaux et al. 2017 (p. ej., una disminución en el glucógeno y una fuerza muscular mejorada en ratones inyectados intratecalmente con AAV GAA). El nivel en suero correlativo de la proteína de fusión de ScFv-GAA es detectable a 5e10 vg y más de 15 ug/ml en los ratones que reciben 1e11 vg (Tabla 9).

Tabla 9: Correlación de dosis en peso y nivel de anti-CD63::GAA en el suero.

Dosis experimental (genomas virales/ratón)	Dosis aproximada en peso (genomas virales/kg)	Nivel de anti-CD63::GAA en el suero (microgramos / ml)
1e10	4e11	indetectable
5e10	2e12	1.97 +/- 1.18
1e11	4e12	15.84 +/- 13.37

Sin limitarse a ninguna teoría, los niveles en suero detectables, p. ej., niveles en suero mayores que 1 ug/ml de GAA enlazada a un dominio de entrega que cruza la barrera hematoencefálica se consideran terapéuticos.

Ejemplo 10: Expresión de proteínas terapéuticas multidominio que comprenden al menos dos dominios de entrega

Se transfectaron células CHO con una construcción de expresión ilustrada en las Figuras 1C-1G, y se confirmó la expresión de cada una de las construcciones (datos no mostrados).

Adicionalmente, la unión de algunas de las proteínas terapéuticas multidominio codificadas por 4W1 y 4M1 (Figura 1F) a CD63 se confirmó por medio de ELISA (datos no mostrados).