



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034468

(51)⁸ A61K 38/47

(13) B

(21) 1-2018-02204

(22) 08/12/2016

(86) PCT/US2016/065647 08/12/2016

(87) WO2017/100467 15/06/2017

(30) 62/264,702 08/12/2015 US; 62/379,629 25/08/2016 US

(45) 26/12/2022 417

(43) 26/11/2018 368A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, United States of America

(72) Katherine CYGNAR (US); Andrew BAIK (US).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHẾ PHẨM VÀ PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH TÍCH TRỮ TRONG LYZOSOM

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị bệnh tích trữ trong lyzosom. Sáng chế đề cập đến phức hợp trị liệu sinh học mà chứa miền liên kết với yếu tố tác động nội bào hóa và hoạt tính enzym thay thế lyzosom. Phức hợp trị liệu sinh học này có khả năng đi vào trong tế bào, di chuyển đến lyzosom, và vận chuyển hoạt tính enzym thay thế đến lyzosom.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến chế phẩm và mô tả phương pháp điều trị bệnh tích trữ trong lysosom. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phức hợp protein được hướng đích mà bao gồm enzym thay thế và sử dụng chúng trong điều trị bệnh tích trữ trong lysosom.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh tích trữ trong lysosom là nhóm các bệnh hiếm mà ảnh hưởng sự phân giải nhiều loại cơ chất trong lysosom. Các cơ chất này bao gồm các sphingolipit, các mucopolysaccharit, các glycoprotein, glycogen, và oligosaccharit, mà có thể tích trữ trong các tế bào của những người bệnh này mà dẫn đến sự chết của tế bào. Các cơ quan bị ảnh hưởng bởi các bệnh tích trữ trong lysosom bao gồm hệ thần kinh trung ương (CNS), hệ thần kinh ngoại biên (PNS), phổi, gan, xương, cơ xương và cơ tim, và hệ lưới nội mô.

Các phương án điều trị các bệnh tích trữ trong lysosom bao gồm liệu pháp thay thế enzym (ERT), liệu pháp giảm cơ chất, liệu pháp nhờ chaperon được lý, liệu pháp cấy ghép tế bào gốc tạo máu, và liệu pháp gen. Một ví dụ về liệu pháp giảm cơ chất bao gồm việc sử dụng Miglustat hoặc Eliglustat để điều trị bệnh Gaucher typ 1. Các dược chất này hoạt động bằng cách khóa hoạt động của synthaza, mà giảm sự tạo ra cơ chất tiếp sau đó. Liệu pháp sử dụng tế bào gốc tạo máu (HSCT), ví dụ, được sử dụng để cải thiện và làm chậm kiểu hình tiêu cực của hệ thần kinh trung ương ở các bệnh nhân mắc các dạng bệnh MPS. Xem R.M. Boustany, “Lysosomal storage diseases--the horizon expands”, 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98, tháng mười năm 2013. Bảng 1 liệt kê một số bệnh tích trữ trong lysosom và các enzym hoặc các protein khác liên quan đến chúng.

Bảng 1: Các bệnh tích trữ trong lysosom

PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC	PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC	PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC
Các rối loạn chuyển hóa sphingolipit	Bệnh Fabry	α -Galactosidaza A
	Bệnh u hạt mỡ Farber	Ceramidaza
	Bệnh Gaucher typ I	β -Glucosidaza
	Bệnh Gaucher typ II và III	Chất hoạt hóa Saposin-C
	Bệnh Niemann-Pick typ A và B	Sphingomyelinaza
	Chứng rối loạn tích tụ gangliosit-GM1	β -Galactosidaza
	Chứng rối loạn tích tụ gangliosit-GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidaza A và B
	Chứng rối loạn tích tụ gangliosit-GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidaza A
	Chứng rối loạn tích tụ gangliosit-GM2 (thiếu hụt chất hoạt hóa GM2)	Protein chất hoạt hóa GM2
	Chứng rối loạn tích tụ gangliosit-GM3	GM3 synthaza
Bệnh do tích tụ Mucopoly-xacarit	Loạn dưỡng chất trắng nhược sắc	Arylsulfataza A
	Thiếu hụt chất hoạt hóa Sphingolipit	Chất hoạt hóa Sphingolipit
	MPS I (bệnh Scheie, Hurler-Scheie, và Hurler)	α -Iduronidaza
	MPS II (Hunter)	Iduronidaza-2-sulphataza
	MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparan N-sulphataza
	MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-acetyl- α -glucosaminidaza
	MPS IIIC (Sanfilippo C)	Axetyl-CoA; α -glucosamit N-acetyltransferaza
	MPS IIID (Sanfilippo D)	N-acetylglucosamin-6-sulphataza
	MPS IVA (hội chứng Morquio A)	N-acetylgalactosamin-6-

PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC	PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC	PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC
		sulphat sulphataza
	MPS IVB (hội chứng Morquio B)	β -Galactosidaza
	MPS VI (Maroteaux-Lamy)	<i>N</i> -axetyl galactosamin-4- sulphataza (arylsulphataza B)
	MPS VII (bệnh Sly)	β -Glucuronidaza
	MPS IX	Hylauronidaza
Bệnh do tích trữ glycogen	Bệnh Pompe (bệnh do tích trữ glycogen typ II)	α -Glucosidaza 2
Chuyển hóa lipit	Chứng thiếu hụt lipaza axit lyzosomal (LAL-D; bệnh Wolman)	Lipaza axit lyzosomal

Hai trong số các LSD phổ biến nhất là bệnh Pompe và Bệnh Fabry. Bệnh Pompe là do enzym alpha-glucosidaza (GAA) lyzosom bị hỏng, mà dẫn đến sự xử lý thiếu hụt glycogen trong lyzosom. Sự tích tụ glycogen trong lyzosom diễn ra chủ yếu là trong các mô xương, tim và gan. Sự phát bệnh Pompe ở trẻ nhỏ gây phì đại tim, giảm trương lực, phì đại gan, và tử vong do suy tim-phổi, thường là trước 2 năm tuổi. Sự phát bệnh Pompe ở người trưởng thành xuất hiện trong giai đoạn từ hai mươi đến sáu mươi tuổi và luôn chỉ liên quan đến cơ xương.

Bệnh Fabry là do enzym alpha-galactosidaza A (GLA) của lyzosom bị sai hỏng, mà dẫn đến sự tích tụ globotriaosylceramid bên trong mạch máu và các mô và cơ quan khác. Các triệu chứng đi kèm theo bệnh Fabry bao gồm đau do sự tổn thương thần kinh và/hoặc sự tắc nghẽn mạch máu nhỏ, thiếu năng thận và cuối cùng là suy thận, các biến chứng về tim như là cao huyết áp và bệnh về cơ tim, các triệu chứng về da liễu như là sự tạo thành các u mạch sừng hóa, giảm tiết mồ hôi hoặc tăng tiết mồ hôi, và các vấn đề về mắt như là giác mạc có xoáy, đục thủy tinh thể hình giống nan hoa, và các bất thường trong mạch máu kết mạc và võng mạc.

Các phương pháp điều trị hiện nay đối với các bệnh tích trữ trong lyzosom ở dưới mức tối ưu. Ví dụ, ERT thường là được sử dụng ở tần suất cao và liều lượng cao,

như là hai lần trên tuần và lên đến 40 mg/kg. Ngoài ra, một số enzym thay thế có thể bị phản ứng chéo miễn dịch (CRIM), kích thích sự tạo ra IgG trong đối tượng và do đó, cản trở sự vận chuyển enzym đến lysosom qua thụ thể manosa-6-phosphat (M6P). Các IgG này có thể che các gốc M6P của enzym thay thế này, và phức kháng nguyên-IgG-kháng thể có thể được đưa vào trong các lysosom tế bào qua thụ thể Fc, do đó, chuyển enzym thay thế này một cách ưu tiên là đến các đại thực bào.

Sự vận chuyển các enzym thay thế đến các mô tác động thích hợp cũng chưa hiệu quả (xem bảng 2 và 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). Ví dụ, các bệnh nhân đang trải qua liệu pháp thay thế enzym lâu dài đối với bệnh Pompe ở trẻ nhỏ vẫn có thể mắc chứng giọng nói tăng âm mũi, yếu cơ còn lại, sa mí mắt, thiếu xương, mất khả năng nghe, nguy cơ sặc, chứng khó nuốt, rối loạn nhịp tim, và nuốt khó khăn. Liều lượng của enzym thay thế đôi khi phải tăng lên theo thời gian đến 40mg/kg trên tuần hoặc hai lần trên tuần.

Bảng 2: Sự nhắm đích mô không hiệu quả của ERT

Bệnh	(Các) phân nhóm	Mô dễ tiếp cận	Mô khó tiếp cận
Bệnh Gaucher	Typ 1	Lá lách, gan, tủy xương	Xương
	Typ 2 và 3	Lá lách, gan, tủy xương	Xương, não
Bệnh Fabry	Khởi phát thông thường và muộn	Nội mạc mạch	Thận, tim
Chứng rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit	Tất cả	Lá lách, gan, tủy xương	Xương, não, sụn
Bệnh do thiếu hụt α -Mannosidaza	---	Lá lách, gan, tủy xương	Xương, não
Bệnh Niemann-Pick	Typ B	Lá lách, gan, tủy xương	Các đại thực bào ở phế nang

Bệnh Pompe	Trẻ nhỏ	---	Tim, cơ trơn và cơ xương
	Khởi phát bệnh muộn	---	Cơ trơn và cơ xương thuộc hệ hô hấp

Thụ thể mannoza-6 phosphat (MPR) nội sinh trung gian cho việc vận chuyển phần lớn các enzym tái tổ hợp đến lyzom. Tồn tại hai dạng bổ sung của MPR là: MPR độc lập với cation (CI-MPR), và MPR phụ thuộc cation (CD-MPR). Các dạng bất hoạt của một trong hai dạng này nhốt các enzym lyzom. Các hydrolaza lyzom được tổng hợp trong lưới nội chất và di chuyển đến mạng lưới cis-Golgi nơi chúng được cải biến theo cách cộng hóa trị bởi sự bổ sung các nhóm mannoza-6 phosphat (M6P). Sự hình thành dấu chuẩn này phụ thuộc vào tác động kế tiếp của hai enzym lyzom: UDP-*N*-axetylglucosamin-1-phosphotransferaza (GlcNac-phosphotransferaza) và *N*-axetylglucosamin-1-phosphodiester- α -*N*-axetylglucosaminidaza (enzym không được che chắn). GlcNac-phosphotransferaza xúc tác việc chuyển gốc GlcNac-1- phosphat từ UDP-GlcNac đến các vị trí C6 của các mannoza được chọn trong các oligoxacarit loại có mannoza cao của các hydrolaza. Sau đó, enzym không được che chắn này loại bỏ đầu GlcNac, mà bộc lộ tín hiệu nhận biết M6P. Ở mạng lưới trans-Golgi, tín hiệu M6P cho phép sự phân tách các hydrolaza lyzom ra khỏi tất cả các loại protein khác qua sự liên kết chọn lọc với các thụ thể M6P. Các bóng tế bào được phủ clathrin được tạo ra, ra nhánh từ mạng lưới trans-Golgi và kết hợp với các thể trong nhân đơn bào muộn. Ở độ pH thấp của thể trong nhân đơn bào muộn này, các hydrolaza tách ra khỏi các thụ thể M6P và các thụ thể trống được tái chế với bộ máy Golgi cho các vòng vận chuyển tiếp theo.

Với sự loại trừ β -glucocerebrosidaza, mà được vận chuyển qua thụ thể mannoza, các enzym lyzom tái tổ hợp bao gồm sự glycosyl hóa M6P và được vận chuyển đến lyzom chủ yếu là qua CI-MPR/IGF2R. Tuy nhiên, sự glycosyl hóa/sự vận chuyển enzym thay thế nhờ CI-MPR không tác động đến tất cả các mô có liên quan về lâm sàng (Bảng 2). Sự cải tiến đối với liệu pháp thay thế enzym đang tập trung vào việc cải thiện việc vận chuyển CI-MPR bằng cách (i) tăng sự biểu hiện bề mặt của CI-MPR sử dụng clenbuterol chất chủ vận β_2 (Koeberl và cộng sự, "Enhanced efficacy of enzyme

replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle”, 103(2) Mol. Genet. Metab. 107-12, 2011), (ii) tăng số lượng gốc M6P trên enzym (Zhu và cộng sự, “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), hoặc (iii) dung hợp miền IGF-II với enzym này (Maga và cộng sự, “Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice”, 288(3) J. Biol. Chem. 1428-38, 2013).

Nhiều bệnh tích trữ trong lysosom được điều trị không thỏa đáng bởi liệu pháp thay thế enzym hoặc liệu pháp gen chủ yếu là do sự hướng đích của enzym thay thế đến mô hoặc cơ quan liên quan. Nhu cầu tồn tại đối với các liệu pháp thay thế enzym mà tăng cường và thúc đẩy sự phân bố về sinh học trong mô và sự hấp thu bởi lysosom enzym này là tốt hơn. Các chủ đơn sáng chế đã phát triển một liệu pháp thay thế enzym cải tiến mà sử dụng sự vận chuyển enzym được hướng dẫn bởi kháng thể không phụ thuộc vào CI-MPR của các enzym đến lysosom của các mô tác động đích.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chủ đơn sáng chế đã phát hiện được rằng các enzym thay thế có thể được vận chuyển cách hiệu quả đến lysosom của tế bào đích đặc hiệu khi được kết hợp với thực thể hướng đích bề mặt tế bào. Tổ hợp của enzym và thực thể hướng đích này được gọi là phức hợp trị liệu sinh học. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm, *tức là*, phức hợp trị liệu sinh học mà bao gồm enzym và protein liên kết kháng nguyên. Enzym liên quan đến bệnh tích trữ trong lysosom (LSD) và protein liên kết kháng nguyên gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa. Yếu tố tác động nội bào hóa trung gian cho sự gắn kết với tế bào và hấp thu vào trong khoang lysosom.

Theo một số phương án, enzym này là enzym bất kỳ trong số α -galactosidaza, β -galactosidaza, α -glucosidaza, β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, xeramidaza, sphingomyelinaza, β -hexosaminidaza, chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arylsulfataza, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparin N-sulfataza, N-axetyl- α -glucosaminidaza, α -glucosamin N-axetyltransferaza, N-axetylglucosamin-6-sulfataza, N-axetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, N-axetylgalactosamin-4-sulfataza, β -glucuronidaza, và hyaluronidaza. Theo một số

phương án, enzym này là isozym mà có hoạt tính giống hoặc tương tự bất kỳ một hoặc nhiều enzym trong số các enzym được liệt kê trên đây. Theo một số phương án, hoạt tính α -glucosidaza có thể được cung cấp bởi isozym như là sucraza-isomaltaza (SI), maltaza-glucoamylaza (MGAM), glucosidaza II (GANAB), hoặc α -glucosidaza trung hòa (C GNAC). Theo một phương án khác, hoạt tính α -galactosidaza A có thể được cung cấp bởi isozym như là α -N-axetyl-galactosaminidaza mà được thiết kế để có được hoạt tính GLA.

Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên là protein bất kỳ mà có thể gắn kết với một hoặc nhiều yếu tố tác động nội bào hóa. Theo các phương án cụ thể hơn, protein liên kết kháng nguyên là một hoặc nhiều phân tử bất kỳ trong số phân tử dung hợp-thụ thể, phân tử bắt giữ, phân tử dung hợp Fc-thụ thể, kháng thể, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fd, mảnh Fv, phân tử Fv đơn chuỗi (scFv), mảnh dAb, vùng xác định bổ sung được phân lập (CDR), peptit CDR3, peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc, kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể đơn miễn, kháng thể xóa miễn, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể nhỏ, thể nano, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, dược phẩm miễn dịch chất điều biến nhỏ (SMIP), kháng thể lạc đà (kháng thể đồng dime của chuỗi nặng VHH), miền IgNAR biến đổi của cá mập, và tương tự. Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa và enzym.

Theo một số phương án, yếu tố tác động nội bào hóa là protein thụ thể, hoặc phối tử mà gắn với protein thụ thể, mà nằm ở trong, trên, hoặc ở màng tế bào và có thể được nhập bào. Theo các phương án cụ thể hơn, yếu tố tác động nội bào hóa là bất kỳ trong số một hoặc nhiều thụ thể gồm CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, thụ thể transferrin, thụ thể LDL, thụ thể protein 1 có liên quan-LDL, ASGR1, ASGR2, protein giống protein tiền phân tử amyloid 2 (APLP2), thụ thể apelin (APLNR), PRLR (thụ thể prolactin), MAL (protein Myelin và tế bào lympho, a.k.a. VIP17), IGF2R, ATPaza loại H⁺ thuộc không bào, thụ thể chất độc bệnh bạch hầu, thụ thể folat, các thụ thể glutamat, thụ thể glutathion, thụ thể leptin, thụ thể dọn dẹp, SCARA1-5, SCARB1-3, và CD36. Theo các phương án nhất định, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu thận, như là CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (thụ thể hoocmon parathyroid), SLC22A13 (thành viên 13 của họ chất mang chất tan 22), SLC5A2 (chất đồng vận chuyển natri/glucoza 2), và

UMOD (Uromodulin). Theo các phương án nhất định khác, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu cơ, như là BMPR1A (thụ thể 1A của protein phát sinh hình thái xương), m-cadherin, CD9, MuSK (kinaza đặc hiệu cơ), LGR4/GPR48 (thụ thể 48 được ghép cặp protein G), thụ thể cholin (nicotin) alpha 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (Integrin alpha-7), CACNG1 (tiểu phân gamma-1 của kênh canxi loại L), CACNAIS (tiểu phân alpha-15 của kênh canxi loại L), CACNG6 (tiểu phân gamma-6 của kênh canxi loại L), SCN1B (tiểu phân beta-1 của kênh natri), CHRNA1 (tiểu phân alpha của thụ thể ACh), CHRND (tiểu phân delta của thụ thể ACh), LRRC14B (protein chứa các đơn vị lặp giàu leuxin 14B), và POPDC3 (protein chứa miền Popeye 3). Theo một số phương án cụ thể, yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CD9, CD63, APLP2, hoặc PRLR. Theo một số phương án cụ thể, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa ưu tiên đại thực bào, bao gồm *ví dụ*, VSIG4 (CRIG), MSR1 (CD204), và MMR1 (MCR1, CD206).

Phức trị liệu sinh học có thể có một định dạng bất kỳ trong số một số định dạng. Theo một số phương án, enzym được liên kết cộng hóa trị với protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm nửa kháng thể (*tức là*, một chuỗi nặng đơn và một chuỗi nhẹ đơn), enzym được liên kết cộng hóa trị với miền Fc của globulin miễn dịch, và miền Fc mà được liên kết cộng hóa trị với enzym này kết hợp với miền Fc của protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể khác, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể, và enzym được liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nặng (hoặc chuỗi nhẹ) của kháng thể đó. Theo một phương án cụ thể khác, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể, và enzym được liên kết cộng hóa trị với đầu N của chuỗi nặng (hoặc chuỗi nhẹ) của kháng thể đó.

Theo các phương án khác, enzym không được liên kết cộng hóa trị với protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa cũng như với enzym. Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa và enzym.

Theo một số phương án, enzym là GAA hoặc isozym có hoạt tính GAA, và yếu tố tác động nội bào hóa là CD9, ITGA7, CD63, APLP2, hoặc PRLR. Theo các phương

án khác, enzym là GLA hoặc isozym có hoạt tính GLA, và yếu tố tác động nội bào hóa là CD9, ITGA7, CD63, APLP2, hoặc PRLR.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh tích trữ trong lyzom (LSD) bao gồm bước là cho đối tượng dùng phức hợp trị liệu sinh học (như đã nêu trên), trong đó phức hợp trị liệu sinh học đi vào trong lyzom của tế bào của đối tượng và cung cấp hoạt tính enzym (“enzym thay thế”) mà thay thế hoạt tính enzym mà đi kèm theo LSD (“enzym nội sinh”). Các LSD bao gồm các rối loạn chuyển hóa sphingolipit, các rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit, và các bệnh liên quan đến tích trữ glycogen. Cụ thể hơn là, LSD có thể điều trị là một hoặc nhiều bệnh bất kỳ trong số các bệnh được liệt kê trong Bảng 1, và enzym thay thế có hoạt tính của enzym tương ứng, được liệt kê trong Bảng 1. Theo một phương án cụ thể, LSD là bệnh Pompe và enzym tương ứng là α -glucosidaza (GAA). Theo một phương án cụ thể khác, LSD là bệnh Fabry và enzym tương ứng là α -Galactosidaza A (GLA). Theo một ví dụ cụ thể khác, LSD là chứng thiếu hụt lipaza axit

lyzosomal (LAL-D) và enzym tương ứng là lipaza axit lyzosomal (LIPA).

Theo một phương án, enzym thay thế không cảm ứng phản ứng miễn dịch ở đối tượng này. Trong một số trường hợp, enzym thay thế là một isozym. Ví dụ, khi enzym nội sinh là α -glucosidaza, isozym là một protein khác mà cung cấp hoạt tính enzym giống hoặc tương tự như α -glucosidaza, như là sucraza-isomaltaza (SI), maltaza-glucoamylaza (MGAM), glucosidaza II (GANAB), và α -glucosidaza trung hòa (C GNAC). Khi enzym nội sinh là α -galactosidaza A (GLA), isozym là một protein khác mà cung cấp hoạt tính enzym giống hoặc tương tự như α -galactosidaza A, như là α -N-acetylgalactosaminidaza được thiết kế để có được hoạt tính GLA.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp chọn lọc hoặc sàng lọc phức hợp trị liệu sinh học mà chứa enzym và protein liên kết kháng nguyên mà thay thế có hiệu quả enzym ở bệnh nhân cần điều trị. Theo một phương án, phức hợp trị liệu sinh học được sử dụng cho hệ thống mô hình và hệ thống mô hình này được đánh giá về hoạt tính enzym được thay thế. Theo một phương án, hệ thống mô hình này là động vật mà thiếu sự biểu hiện enzym và biểu hiện kháng nguyên cùng gốc của protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, mô hình động vật này là chuột mà biểu hiện

kháng nguyên cùng gốc được làm giống với của người của protein liên kết kháng nguyên và với sự bất hoạt (knock-out) gen mã hóa enzym này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 biểu diễn dạng giản đồ các phức hợp trị liệu sinh học. Hình A mô tả phức hợp trị liệu sinh học gồm một kháng thể đặc hiệu kép (ii) và một enzym thay thế (i). Hình B mô tả polypeptit dung hợp Fc-enzym (i) kết hợp với nửa kháng thể (nửa kháng thể) đặc hiệu yếu tố tác động nội bào hóa (ii) để tạo ra phức hợp trị liệu sinh học. Hình C mô tả enzym thay thế (hình lục giác) liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nặng của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa. Hình D mô tả enzym thay thế (hình lục giác) liên kết cộng hóa trị với đầu N của chuỗi nặng của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa. Hình E mô tả enzym thay thế (hình lục giác) liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa. Hình F mô tả enzym thay thế (hình lục giác) liên kết cộng hóa trị với đầu N của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa. Các đường cong trong các hình C, D, E và F biểu thị các phân tử nối.

Fig. 2 mô tả ảnh lai western blot không khử sử dụng kháng thể kháng hFc của dịch nổi của tế bào CHO biểu hiện protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa (IE-BP) hoặc protein thay thế cho bệnh tích trữ trong lysosom (LSD-RP). Làn 1 được nạp IgG4 kháng CD63, làn 2 với GAA-Fc nút, làn 3 với IgG4 kháng CD63 GAA, và làn 4 GAA IgG4 kháng CD63.

Fig. 3 mô tả các sơ đồ cột biểu thị hoạt tính GAA xấp xỉ như được xác định bằng cách sử dụng cơ chất huỳnh quang 4-methylumbelliferyl- α -glucosit. Các trục Y trong hình A và hình B là lượng mol của cơ chất được thủy phân trên một mol protein trên một giờ. Các trục X liệt kê từng protein dung hợp GAA.

Fig. 4 mô tả các sơ đồ đường biểu thị hoạt tính GAA ước tính của các cấu trúc GAA được nội hóa bởi các tế bào HEK. Các trục Y trong hình A và hình B biểu thị số nanomol cơ chất được thủy phân trên một mg dịch ly giải tế bào trên một giờ. Các trục X biểu thị nồng độ tăng dần của cấu trúc GAA. Trong hình A, các hình vuông (■) biểu thị kháng thể kháng CD63-GAA được sử dụng cho các tế bào HEK khi có mặt mannoza-6-phosphat (M6P) 5mM, chất cạnh tranh của chất nhắm đích lysosom trung

gian bởi MPR, và các hình tròn (D) biểu thị kháng thể kháng CD63-GAA được sử dụng một mình cho các tế bào HEK. Hình B, các hình tròn (D) biểu thị kháng thể kháng CD63-GAA được sử dụng cho các tế bào HEK, các hình vuông (■) biểu thị kháng thể kháng CD63-GAA đột biến, mà không liên kết với CD63, được sử dụng cho các tế bào HEK, và các hình tam giác (▲) biểu thị kháng thể kháng CD63-GAA được sử dụng cho các tế bào A CD63 HEK, mà không biểu hiện CD63.

Fig. 5 mô tả các sơ đồ đường biểu thị hoạt tính GAA ước tính của các cấu trúc GAA được nội hóa bởi các nguyên bào cơ của người (hình A) hoặc các nguyên bào cơ của chuột (hình B). Các trục Y trong hình A và hình B biểu thị số nanomol cơ chất được thủy phân trên một mg dịch ly giải tế bào trên một giờ. Các trục X biểu thị nồng độ tăng dần của cấu trúc GAA, kháng thể kháng CD63-GAA hoặc mycGAA, khi có mặt hoặc vắng mặt M6P.

Fig. 6 mô tả nồng độ GAA (hình A) và hàm lượng glycogen (hình B) của ba dòng tế bào Pompe (GM20089, GM20090, và GM20091) được so sánh với GAA kiểu dại-các nguyên bào sợi da của người mới được tạo thành (NHDF). Hình A là ảnh lai western blot kháng hGAA mô tả protein GAA còn lại trong các dòng tế bào Pompe và các nồng độ kiểu dại của protein GAA trong các NHDF. Hình B là sơ đồ cột mô tả hàm lượng glycogen ở đơn vị microgam trên một triệu tế bào sau khi cắt giảm glucoza để giảm glycogen trong bào tương.

Fig. 7 mô tả ở dạng sơ đồ cột sự thoát khỏi các sai sót về tích tụ glycogen đối với các dòng tế bào Pompe GM20089 (hình A), GM20090 (hình B), và GM20091 (hình C) bởi kháng thể kháng CD63-GAA 200 nM hoặc myc-GAA 200 nM. Trục Y biểu thị hàm lượng glycogen ở dạng microgam trên một gam dịch ly giải tế bào.

Fig. 8 mô tả ảnh lai western blot không khử kháng hFc của dịch nổi chiết xuất của tế bào CHO chứa kháng thể kháng CD63-GLA (lần 1), GLA-Fc nút (lần 2), GLA-kháng thể kháng CD63 (lần 3), kháng thể kháng myc nút (lần 4), kháng thể kháng CD63 hole (lần 5), và hỗn hợp của dịch nổi mà chứa kháng thể kháng myc nút và kháng thể kháng CD63 hole (lần 6).

Fig. 9 mô tả ở dạng sơ đồ cột về hoạt tính enzym của GLA (trục Y thể hiện số nanomol cơ chất được thủy phân trên một nanomol protein dung hợp trên một giờ) của protein dung hợp chứa GLA, bao gồm từ trái sang phải trên trục X, kháng thể kháng

CD63-GLA (cấu trúc đầu C của chuỗi nặng), GLA-Fc, GLA-kháng thể kháng CD63 (cấu trúc đầu N của chuỗi nặng), GLA-myc-FLAG, và GLA 6-his.

Fig. 10 mô tả sơ đồ đường biểu thị hoạt tính GLA xấp xỉ được tìm thấy trong các dịch chiết của các tế bào HEK mà chứa các cấu trúc mà được nội hóa bằng các tế bào HEK này. Trục Y biểu thị hoạt tính GLA ở lượng nanomol cơ chất được thủy phân trên một miligam dịch ly giải tế bào trên một giờ. Các trục X biểu thị nồng độ tăng dần của cấu trúc GAA. Đường trên cùng là GLA-kháng CD63, đường giữa là GLA-myc cộng kháng thể đặc hiệu kép kháng myc/kháng CD63, và đường dưới là GLA-myc.

Fig. 11 mô tả các sơ đồ đường biểu diễn sự hấp thu các protein được gắn tag pHrodo vào trong phân đoạn có độ pH thấp (*tức là*, phân đoạn lysosom) của các tế bào HEK (hình A), các tế bào PC-3 (hình B), và các tế bào HepG2 (hình 3). Các hình tròn (D) biểu thị kháng thể kháng CD63 được gắn tag pHrodo, các hình vuông (■) biểu thị kháng thể kháng APLP2 được gắn tag pHrodo, và các hình tam giác (▲) biểu thị GLA được gắn tag pHrodo.

Fig. 12 mô tả các ảnh lai western blot được khử của dịch ly giải tế bào mà chứa kháng thể kháng CD63-GAA được nội hóa. Mỗi lần biểu thị cho dịch chiết tế bào được chuẩn bị ở các ngày cụ thể sau khi nội hóa protein. Hình A là ảnh lai western blot được gắn đầu dò kháng thể kháng GAA. Kháng thể kháng CD63-GAA 150 kDa được hiển thị ở thang đo ← a. Dạng có hoạt tính 76 kDa của GAA lysosom được hiển thị ở thang đo ← b. Hình B là ảnh lai western blot được gắn đầu dò kháng thể kháng hIgG. Kháng thể kháng CD63-GAA 150 kDa được hiển thị ở thang đo c →. Kháng thể chuỗi nặng (50 kDa) được hiển thị ở thang đo d →. Kháng thể chuỗi nhẹ (23 kDa) được hiển thị ở thang đo e →.

Fig. 13 mô tả ảnh lai western blot của kháng thể kháng hGAA. Băng 76 kDa biểu thị GAA trưởng thành. Lần 1 chứa dịch chiết gan từ chuột có CD63 được làm giống như của người được điều trị kháng thể kháng CD63- GAA, lần 2 thận, lần 3 tim, lần 4 cơ song đầu, lần 5 cơ tứ đầu, và lần 6 cơ hoành.

Fig. 14 mô tả ảnh lai western blot kháng thể kháng hGAA của các dịch chiết mô từ chuột kiểu đại (+/+) và chuột CD63 có được làm giống như của người (hu/hu) sau 24 giờ được điều trị bằng kháng thể kháng hCD63-GAA ở liều lượng 50 mg/kg.

Dạng có hoạt tính 76 kDa lyzom của GAA được hiển thị. Làn 1 và 2 là các dịch chiết từ tim, tương ứng là của chuột kiểu dại và chuột được làm giống như của người. Làn 3 và 4 là các dịch chiết cơ song đầu từ chuột kiểu dại và chuột được làm giống như của người. Làn 5 và 6 là các dịch chiết cơ hoành từ chuột kiểu dại và chuột được làm giống như của người.

Fig. 15 biểu đồ tần suất mô tả lượng tương đối của kháng thể kháng integrin alpha 7, kháng thể kháng CD9, và kháng thể kháng dystroglycan được tìm thấy bên trong cơ song đầu, cơ tứ đầu, cơ hoành, tim, gan, thận, và lá lách, được chuẩn hóa đến mức độ được tìm thấy trong gan.

Fig. 16 là biểu đồ tần suất biểu thị việc nhắm đích lyzom của các kháng thể được gắn tag pHrodo. Trục Y biểu thị tín hiệu huỳnh quang từ các bóng tế bào được chuẩn hóa. Trục X biểu thị từng kháng thể, từ trái sang phải: kháng thể kháng myc, kháng thể kháng CD63, kháng thể kháng dystroglycan, kháng thể kháng M-cadherin, kháng thể kháng CD9, và kháng thể kháng integrin alpha 7.

Fig. 17 là sơ đồ dạng chấm mô tả nồng độ glycogen được thể hiện ở số microgam glycogen trên một miligam mô. Mô được mô tả trên trục X từ trái sang phải là tim, cơ tứ đầu, cơ song đầu, cơ hoành, và cơ tam đầu. Các hình tròn (●) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA (KO), các hình vuông (■) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng kháng thể kháng mCD63-GAA, các hình tam giác đỉnh hướng lên (▲) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng hGAA, và các hình tam giác đỉnh hướng xuống (▼) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột kiểu dại không được điều trị. Các liệu pháp điều trị được sử dụng bằng cách vận chuyển thủy động lực học các cấu trúc ADN.

Fig. 18 là sơ đồ dạng chấm mô tả nồng độ glycogen được thể hiện ở số microgam glycogen trên một miligam mô. Mô được mô tả trên trục X từ trái sang phải là tim, cơ tứ đầu, cơ song đầu, cơ hoành, và cơ tam đầu. Các hình tròn (●) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA (KO), các hình vuông (■) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng kháng thể kháng mCD63-GAA, các hình tam giác đỉnh hướng lên (▲) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng kháng thể kháng hCD63-GAA, và các hình tam giác đỉnh hướng xuống (▼) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột kiểu dại không được

điều trị. Các liệu pháp điều trị được sử dụng bằng cách vận chuyển thủy động lực học các cấu trúc ADN.

Fig. 19 là biểu đồ tần suất mô tả hoạt tính lipaza được biểu hiện là lượng nanomol cơ chất (4-methylumbelliferyl oleat) được thủy phân trên một giờ (trục Y) bằng kháng thể kháng myc, axit lipaza lysosom nguyên bản (LIPA), protein dung hợp kháng thể kháng myc-LIPA (dung hợp đầu C của chuỗi nặng), và LIPA-kháng thể kháng myc (dung hợp đầu N của chuỗi nặng).

Fig. 20 là sơ đồ dạng chấm mô tả nồng độ glycogen được thể hiện ở số microgam glycogen trên một miligam mô. Mô được mô tả trên trục X từ trái sang phải là tim, cơ tam đầu, cơ tứ đầu, cơ song đầu và cơ hoành. Các hình tròn (●) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA (KO), các hình vuông (■) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng kháng thể kháng mCD63-GAA, các hình tam giác đỉnh hướng lên (▲) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột bất hoạt GAA được điều trị bằng kháng thể kháng hCD63-GAA, và các hình tam giác đỉnh hướng xuống (▼) biểu thị nồng độ glycogen trong chuột kiểu dại không được điều trị. Các liệu pháp điều trị được sử dụng bằng cách vận chuyển thủy động lực học (HDD) các cấu trúc ADN.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án, chế phẩm, phương pháp và các điều kiện thí nghiệm cụ thể mà được mô tả, các phương án, chế phẩm, phương pháp có thể thay đổi. Hệ thống thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ cho mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được nhằm để giới hạn, do phạm vi của sáng chế sẽ chỉ được giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ mà tương tự hoặc tương đương với những phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực tế hoặc trong thử nghiệm sáng chế, dưới đây, một số phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên sẽ được mô tả. Tất cả các tài liệu công bố được trích dẫn ở đây được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu để mô tả toàn bộ nội dung của chúng. Trừ trường hợp điều khác được quy định, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học

được sử dụng ở đây có ý nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế.

“Các bệnh tích trữ trong lysosom” bao gồm rối loạn bất kỳ mà do sự sai hỏng về chức năng lysosom. Hiện nay, xấp xỉ 50 chứng rối loạn đã được xác định, chứng rối loạn được biết đến nhiều nhất trong số các rối loạn này bao gồm Tay-Sachs, Gaucher, và bệnh Niemann-Pick. Các tác nhân gây bệnh của các bệnh này được cho là sự tăng dần các sản phẩm phân giải không hoàn toàn trong lysosom, thường là do mất chức năng của protein. Các bệnh tích trữ trong lysosom do mất chức năng hoặc sự suy giảm các biến thể trong các protein mà có chức năng bình thường mà để phân giải hoặc phối hợp với sự phân giải các hàm lượng trong lysosom. Các protein liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom bao gồm các enzyme, các thụ thể và các protein xuyên màng khác (ví dụ, NPC1), các protein cải biến sau dịch mã (ví dụ, sulfatasa), protein vận chuyển màng, và đồng yếu tố không enzyme và các protein tan khác (ví dụ, chất hoạt hóa GM2 gangliosit). Do vậy, các bệnh tích trữ trong lysosom bao hàm ngoài các rối loạn do các enzyme sai hỏng *ở chính chúng*, và bao gồm rối loạn bất kỳ mà do sai hỏng phân tử bất kỳ. Do vậy, khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “enzyme” có nghĩa là bao gồm các protein khác mà liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom.

Bản chất của sự tổn thương phân tử này ảnh hưởng đến tính nghiêm trọng của bệnh trong nhiều trường hợp, *tức là* sự mất hoàn toàn chức năng có xu hướng liên quan đến sự khởi phát trước sinh hoặc mới sinh, và liên quan đến các triệu chứng nghiêm trọng; mất một phần chức năng liên quan đến các rối loạn nhẹ hơn (tương đối) và bệnh khởi phát muộn hơn. Nhìn chung, chỉ một tỷ lệ phần trăm hoạt tính nhỏ cần được phục hồi cần có để sửa chữa các sai sót về chuyển hóa trong các tế bào sai hỏng. Bảng 1 liệt kê một vài trong số các bệnh tích trữ trong lysosom phổ biến và các protein bị mất chức năng có liên quan của chúng. Các bệnh tích trữ trong lysosom, nhìn chung, được mô tả trong Desnick và Schuchman, 2012.

Các bệnh tích trữ trong lysosom có thể được phân loại theo loại sản phẩm mà tích tụ bên trong lysosom sai hỏng. Các bệnh rối loạn chuyển hóa sphingolipit là nhóm bệnh mà ảnh hưởng đến sự chuyển hóa các sphingolipit, mà là các lipit chứa các axit béo được nối với rượu amino béo (tổng quan trong S. Hakomori, “Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis”, 50 Annual Review of

Biochemistry 733-764, tháng bảy năm 1981). Các sản phẩm tích tụ của các rối loạn chuyển hóa sphingolipit bao gồm gangliosit (ví dụ, bệnh Tay-Sachs), glycolipit (ví dụ, bệnh Fabry), và glucocerebroside (ví dụ, bệnh Gaucher).

Chúng rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit là nhóm gồm các bệnh mà ảnh hưởng đến sự chuyển hóa của các glycosaminoglycan (GAGS hoặc mucopolysaccharit), mà là các chuỗi không phân nhánh dài gồm các dixacarit lặp lại mà giúp xây dựng nên xương, sụn, dây chằng, giác mạc, da và mô liên kết (được tổng hợp trong J. Muenzer, ““Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses”, 111(2) Mol. Genet. Metab. 63-72 (tháng hai năm 2014); Sasisekharan và cộng sự, “Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans”, 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (tháng mười hai năm 2014)). Các sản phẩm tích tụ của các rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit bao gồm heparan sulfat, dermatan sulfat, keratin sulfat, các dạng khác nhau của chondroitin sulfat, và axit hyaluronic. Ví dụ, hội chứng Morquio A là do sự sai hỏng trogn enzym galactosa-6-sulfat sulfataza lyzosom, mà dẫn đến sự tích tụ keratin sulfat và chondroitin 6-sulfat trong lyzosom.

Các bệnh do tích trữ glycogen (a.k.a., bệnh tích trữ glycogen) là do sự không có khả năng của tế bào để chuyển hóa (tạo ra hoặc bẻ gãy) glycogen. Chuyển hóa glycogen được điều tiết bởi nhiều enzym khác nhau hoặc các protein khác bao gồm glucoza-6-phosphataza, axit alpha-glucosidaza, enzym loại bỏ phân nhánh của glycogen, enzym phân nhánh glycogen, glycogen phosphorylaza cơ, glycogen phosphorylaza gan, phosphofructokinaza cơ, phosphorylaza kinaza, chất vận chuyển glucoza, aldolaza A, beta-enolaza, và glycogen synthaza. Bệnh tích trữ trong lyzosom/tích trữ glycogen trong lyzosom là bệnh Pompe, trong đó, alpha-glucosidaza axit sai hỏng dẫn đến tích tụ glycogen trong lyzosom. Các triệu chứng bao gồm phì đại gan, yếu cơ, suy tim, và trong trường hợp biến chứng ở trẻ nhỏ, tử vong trước 2 tuổi (xem DiMauro và Spiegel, “Progress and problems in muscle muscle glycogenosis”, 30(2) Acta Myol. 96-102 (tháng mười năm 2011)).

“Phức hợp trị liệu sinh học” bao gồm (i) một protein đơn mà bao gồm nhiều hơn một miền có chức năng, (ii) protein mà bao gồm nhiều hơn một chuỗi polypeptit, và (iii) hỗn hợp gồm nhiều hơn một protein hoặc nhiều hơn một polypeptit. Thuật ngữ polypeptit thường là được dùng với nghĩa là chuỗi đơn của các axit amin được nối với

nhau qua các liên kết peptit. Thuật ngữ protein bao hàm thuật ngữ polypeptit, mà còn bao gồm các cấu trúc phức tạp hơn. Tức là, một polypeptit đơn là một protein, và một protein có thể bao gồm một hoặc nhiều polypeptit được kết hợp theo cấu trúc ở bậc cao hơn. Ví dụ, hemoglobin là protein mà gồm bốn polypeptit: hai globin polypeptit alpha và hai globin polypeptit beta. Myoglobin cũng là protein, nhưng nó chỉ gồm một myoglobin polypeptit duy nhất.

Phức trị liệu sinh học chứa một hoặc nhiều polypeptit và ít nhất là hai chức năng. Một trong các chức năng này là sự thay thế hoạt tính protein sai hỏng liên quan đến bệnh tích trữ trong lysosom. Chức năng còn lại trong các chức năng này là gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa. Do đó, một polypeptit đơn mà tạo ra hoạt tính protein lysosom (ví dụ, hoạt tính enzym hoặc hoạt tính chất vận chuyển; hoạt tính của protein liên quan đến bệnh trong lysosom a.k.a. (LSD-RP)) và khả năng gắn với yếu tố tác động nội bào hóa (protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa a.k.a. (hoạt tính IE-BP)) là phức hợp trị liệu sinh học. Ngoài ra, hỗn hợp protein, trong đó một protein có chức năng của protein lysosom, và một protein khác có hoạt tính gắn với yếu tố tác động nội bào hóa, là phức hợp trị liệu sinh học. Fig. 1 mô tả các ví dụ khác nhau về phức hợp trị liệu sinh học. Theo một ví dụ (Fig. 1, hình A), phức hợp trị liệu sinh học chứa protein thay thế lysosom (LSD-RP được biểu diễn bằng hình lục giác) và kháng thể đặc hiệu kép (1E-BP) mà gắn với protein thay thế lysosom này (đường nét đứt) và yếu tố tác động nội bào hóa (đường nét liền). Ở đây, một bên cánh tay của kháng thể đặc hiệu kép liên kết không cộng hóa trị với LSD-RP, và cánh tay còn lại liên kết không cộng hóa trị với yếu tố tác động nội bào hóa, nhờ đó, cho phép nội hóa protein thay thế (LSD-RP) đi vào trong lysosom. Theo một ví dụ khác (hình B), phức hợp trị liệu sinh học gồm một protein đơn chứa hai polypeptit, một polypeptit có chức năng LSD-RP và polypeptit còn lại có chức năng IE-BP. Ở đây, LSD-RP được dung hợp với miền Fc hoặc vùng cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch, mà kết hợp với miền Fc của nửa kháng thể LSD-RP để tạo ra phức hợp trị liệu sinh học hai chức. Phương án được mô tả trong hình B tương tự với phương án trong hình A, ngoại trừ là LSD-RP được gắn cộng hóa trị với một trong số các nửa kháng thể, chứ không qua tương tác kháng nguyên-kháng thể ở miền biến đổi của globulin miễn dịch của nửa kháng thể này.

Trong các ví dụ khác, phức hợp trị liệu sinh học bao gồm LSD-RP liên kết cộng hóa trị (trực tiếp hoặc gián tiếp qua phần tử nối) với IE-BP. Theo một phương án,

LSD-RP được gắn vào đầu C của phân tử globulin miễn dịch (ví dụ, chuỗi nặng hoặc ngoài ra, chuỗi nhẹ). Theo một phương án khác, LSD-RP được gắn vào đầu N của phân tử globulin miễn dịch (ví dụ, chuỗi nặng hoặc ngoài ra, chuỗi nhẹ). Trong các ví dụ này, phân tử globulin miễn dịch là IE-BP.

“Protein liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom” hoặc “LSD-RP” để chỉ protein bất kỳ liên quan đến nguyên nhân hoặc tác động sinh lý của bệnh tích trữ trong lysosom. LSD-RP bao gồm enzym thực tế, protein vận chuyển, thụ thể, hoặc protein khác mà mất chức năng và được cho là không hoạt động và mà được cho là sự tổn thương về phân tử mà là nguyên nhân gây bệnh. LSD-RP còn bao gồm protein bất kỳ mà có thể tạo ra hoạt tính hóa sinh hoặc sinh lý đủ hoặc giống mà thay thế hoặc tránh né sự tổn thương về phân tử của bệnh. Ví dụ, “isozym” có thể được sử dụng như một LSD-RP. Các ví dụ về các protein liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom bao gồm các protein liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom được liệt kê trong 1 như là “Enzym/Protein có liên quan” và bất kỳ protein hoặc phân tử đã biết hoặc được phát hiện sau này nào mà tránh được sự sai hỏng về phân tử của bệnh tích trữ trong lysosom.

Trong trường hợp của bệnh Pompe, trong đó sự sai hỏng về phân tử là sai hỏng về hoạt tính α -glucosidaza, các LSD-RP bao gồm α -glucosidaza của người, và “các isozym” như là α -glucosidaza khác, α -glucosidaza thiết kế tái tổ hợp, các glucosidaza khác, các glucosidaza tái tổ hợp, protein bất kỳ được thiết kế để thủy phân gốc α -glucoza liên kết 1-4 đầu không khử để giải phóng một phân tử α -glucosidaza đơn, enzym EC 3.2.1.20 bất kỳ, các hydrolaza hydrat cacbon pH thấp tự nhiên hoặc tái tổ hợp dùng cho glycogen hoặc tinh bột, và các glucosyl hydrolaza như là sucraza isomaltaza, maltaza glucoamylaza, glucosidaza II, và α -glucosidaza trung hòa.

“Yếu tố tác động nội bào hóa” bao gồm protein mà có khả năng được nội bào hóa vào trong tế bào hoặc cái mà theo cách khác tham gia vào hoặc góp phần vào sự vận chuyển qua màng ngược chiều. Trong một số trường hợp, yếu tố tác động nội bào hóa là protein mà trải qua quá trình xuyên bào; tức là, protein này được nội hóa ở một phía của tế bào và được vận chuyển sang phía còn lại của tế bào này (ví dụ, từ đỉnh xuống đáy). Theo nhiều phương án, protein yếu tố tác động nội bào hóa là protein

được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc protein ngoại bào tan. Tuy nhiên, sáng chế còn bao hàm các phương án mà trong đó protein yếu tố tác động nội bào hóa được biểu hiện bên trong khoang nội bào như là thể trong nhân đơn bào, lưới nội chất, Golgi, lysosom, v.v.. Ví dụ, các protein liên quan đến vận chuyển qua màng ngược chiều (ví dụ, các quá trình từ các thể trong nhân đơn bào sớm/tái chế đến mạng lưới trans-Golgi) có thể đóng vai trò làm các protein yếu tố tác động nội bào hóa trong nhiều phương án khác nhau theo sáng chế. Trong sự kiện (event) bất kỳ, việc gắn kết của IE-BP với protein yếu tố tác động nội bào hóa khiến toàn bộ phức hợp trị liệu sinh học này, và các phân tử bất kỳ mà kết hợp với nó (ví dụ, LSD-RP), cũng được nội hóa đi vào trong tế bào. Như được giải thích dưới đây, các protein yếu tố tác động nội bào hóa bao gồm các protein được nội hóa trực tiếp đi vào trong tế bào, cũng như các protein được nội hóa gián tiếp đi vào trong tế bào.

Các protein yếu tố tác động nội bào hóa được nội hóa trực tiếp đi vào trong tế bào bao gồm các phân tử liên kết với màng có ít nhất một miền ngoại bào (ví dụ, các protein xuyên màng, các protein được giữ bởi GPI, v.v.), mà trải qua quá trình nội hóa tế bào, và tốt hơn là được xử lý qua quá trình phân giải và/hoặc tái chế. Các ví dụ không giới hạn về các protein yếu tố tác động nội bào hóa được nội hóa trực tiếp đi vào trong tế bào bao gồm, ví dụ, CD63, MHC-I (ví dụ, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, thụ thể transferrin, thụ thể LDL, thụ thể protein 1 có liên quan-LDL, ASGR1, ASGR2, protein giống protein tiền phân tử amyloid 2 (APLP2), thụ thể apelin (APLNR), MAL (protein Myelin và tế bào lympho, a.k.a. VIP17), IGF2R, ATPaza loại H⁺ thuộc không bào, thụ thể chất độc bệnh bạch hầu, thụ thể folat, các thụ thể glutamat, thụ thể glutathion, thụ thể leptin, thụ thể dọn dẹp (ví dụ, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36), và tương tự.

Theo các phương án nhất định, yếu tố tác động nội bào hóa là thụ thể prolactin (PRLR). Đã phát hiện được rằng PRLR, không chỉ là đích cho các ứng dụng điều trị nhất định, mà còn là protein yếu tố tác động nội bào hóa có hiệu quả trên cơ sở tốc độ nội hóa và quay trở lại của nó. Tiềm năng để PRLR làm protein yếu tố tác động nội bào hóa, ví dụ, được minh họa trong W02015/026907, trong đó, đã được chứng minh rằng, ví dụ, các kháng thể kháng PRLR được nội hóa hiệu quả bằng các tế bào biểu hiện PRLR *in vitro*.

Theo các phương án nhất định, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu thận, như là CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (thụ thể hoocmon parathyroid), SLC22A13 (thành viên 13 của họ chất mang chất tan 22), SLC5A2 (chất đồng vận chuyển natri/glucose 2), và UMOD (Uromodulin). Theo các phương án nhất định khác, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu cơ, như là BMPR1A (thụ thể 1A của protein phát sinh hình thái xương), m-cadherin, CD9, MuSK (kinaza đặc hiệu cơ), LGR4/GPR48 (thụ thể 48 được ghép cặp protein G), thụ thể cholin (nicotin) alpha 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrin alpha-7), CACNG1 (tiểu phần gamma-1 của kênh canxi loại L), CACNA1S (tiểu phần alpha-15 của kênh canxi loại L), CACNG6 (tiểu phần gamma-6 của kênh canxi loại L), SCN1B (tiểu phần beta-1 của kênh natri), CHRNA1 (tiểu phần alpha của thụ thể ACh), CHRND (tiểu phần delta của thụ thể ACh), LRRC14B (protein chứa các đơn vị lặp giàu leuxin 14B), và POPDC3 (protein chứa miền Popeye 3). Trong một số phương án cụ thể, yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, hoặc PPRLR.

Trong các phương án này, trong đó, yếu tố tác động nội bào hóa (IE) được nội hóa trực tiếp đi vào trong tế bào, IE-BP có thể là, *ví dụ*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với IE, hoặc phối tử hoặc phần của phối tử mà tương tác đặc hiệu với IE. Ví dụ, nếu IE là Kremen-1 hoặc Kremen-2, IE-BP có thể chứa hoặc bao gồm phối tử Kremen (*ví dụ*, DKK1) hoặc phần gắn kết Kremen của nó. Là một ví dụ khác, nếu IE là phân tử thụ thể như là ASGR1, IE-BP có thể chứa hoặc bao gồm phối tử đặc hiệu thụ thể này (*ví dụ*, asialoorosomucoit [ASOR] hoặc Beta-GalNAc) hoặc phần gắn kết thụ thể của nó.

Các protein yếu tố tác động nội bào hóa được nội hóa gián tiếp đi vào trong tế bào bao gồm proteins và polypeptit mà tự bản thân chúng nội hóa được, nhưng được nội hóa đi vào trong tế bào sau khi liên kết hoặc theo cách khác, kết hợp với protein hoặc polypeptit thứ hai mà được nội hóa trực tiếp đi vào trong tế bào. Các protein được nội hóa gián tiếp đi vào trong tế bào bao gồm, *ví dụ*, các phối tử tan mà có khả năng gắn kết với phân tử thụ thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào đang được nội hóa. Một ví dụ không giới hạn về phối tử tan mà được nội hóa (gián tiếp) đi vào trong tế bào qua sự tương tác của nó với phân tử thụ thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào đang được nội hóa là transferrin. Theo các phương án, mà trong đó IE là transferrin (hoặc protein được nội hóa gián tiếp khác), việc gắn kết IE-BP với IE, và tương tác của IE

với thụ thể transferrin (hoặc phân tử thụ thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào đang được nội hóa khác), khiến toàn bộ IE-BP, và bất kỳ phân tử nào kết hợp với đó (*ví dụ*, LSD-RP), được nội hóa vào trong tế bào đồng thời với sự nội hóa IE và phân tử cặp liên kết của nó.

Trong các phương án này, trong đó, IE được nội hóa gián tiếp đi vào trong tế bào, IE- BP có thể là, *ví dụ*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với IE, hoặc thụ thể hoặc phần của thụ thể mà tương tác đặc hiệu với protein yếu tố tác động tan. Ví dụ, nếu IE là xytokin, IE-BP có thể chứa hoặc bao gồm thụ thể xytokin tương ứng hoặc phần gắn kết phối tử của nó.

IE ví dụ là CD63, mà là thành viên của siêu họ tetraspanin của các protein bề mặt tế bào mà mở rộng màng tế bào lên gấp bốn lần. CD63 được biểu hiện trong hầu như tất cả các mô và được cho là liên quan đến việc tạo ra và làm ổn định hóa các phức tạo tín hiệu. CD63 định vị đến màng tế bào, màng lysosom, và màng thể trong nhân đơn bào muộn. CD63 được biết là kết hợp với các integrin và có thể liên quan đến việc chuyển biểu mô- trung mô. Xem H. Maecker và cộng sự, “The tetraspanin superfamily: molecular facilitators”, 11(6) FASEB J. 428-42, tháng năm năm 1997; và M. Metzelaar và cộng sự, “CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells”, 266 J. Biol. Chem. 3239-3245, 1991.

Một IE ví dụ khác là protein giống tiền phân tử beta amyloid (A4) 2 (“APLP2”), thành viên biểu hiện ubiquitous thuộc họ APP (protein tiền phân tử amyloid). APLP2 là protein liên kết với màng được biết đến là tương tác với các phân tử phức tương hợp mô chính (MHC) lớp I (*ví dụ*, Kd). Nó liên kết với Kd ở bề mặt tế bào và được nội hóa theo cách phụ thuộc Nclathri với sự kiểm soát Kd. Xem Tuli và cộng sự, “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).

Một IE ví dụ khác là thụ thể prolactin (PRLR). Thụ thể prolactin là một thành viên thuộc họ thụ thể xytokin typ I và sau khi gắn kết với phối tử và sự dime hóa sau đó kích hoạt “các tyrosin kinaza Jak2, Fyn và Tec, phosphatase SHP-2, nhân tố trao đổi nucleotit guanin Vav, và chất ức chế truyền tín hiệu SOCS”, (xem Clevenger và

Kline, “Prolactin receptor signal transduction”, 10(10) *Lupus* 706-18 (2001), tóm tắt). Thụ thể prolactin trải qua quá trình tái chế nhập bào và có thể được tìm thấy trong các phân đoạn lysosom. Xem Genty và cộng sự, “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); và Ferland và cộng sự, “The effect of chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver”, 115(5) *Endocrinology* 1842-9 (1984).

Khi được sử dụng ở đây, “phản ứng miễn dịch” có nghĩa chung là đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân với protein bên ngoài hoặc “không phải của bản thân” bệnh nhân. Đáp ứng miễn dịch này bao gồm phản ứng dị ứng và sự phát triển của các kháng thể mà gây cản trở đến tính hữu hiệu của enzym thay thế. Một số bệnh nhân có thể không tạo ra protein bất kỳ trong số các protein không có chức năng, do đó, khiến enzym thay thế trở thành protein “ngoại lai”. Ví dụ, việc tiêm lặp lại GLA tái tổ hợp (rGLA) cho các bệnh nhân mắc bệnh Fabry mà thiếu GLA thường xuyên dẫn đến phản ứng dị ứng. Ở các bệnh nhân khác, sự tạo ra các kháng thể chống lại rGLA đã được chứng minh là làm giảm tính hiệu quả của enzym thay thế trong việc điều trị bệnh. Xem ví dụ Tajima và cộng sự (“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)), thảo luận về việc sử dụng NAGA được cải biến làm “isozym” để thay thế GLA. NAGA được cải biến không có tính phản ứng chéo miễn dịch với GLA, và “không phản ứng với huyết thanh từ bệnh nhân mắc bệnh Fabry được điều trị liên tục bằng GLA tái tổ hợp”. *Id.*, tóm tắt.

Thuật ngữ “protein” có nghĩa là polyme axit amin bất kỳ mà có nhiều hơn khoảng 20 axit amin liên kết cộng hóa trị qua các liên kết amit. Các protein chứa một hoặc nhiều các chuỗi polyme axit amin, thường được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật này là “các polypeptit”. Như vậy, một polypeptit có thể là một protein, và một protein có thể bao gồm nhiều polypeptit để tạo ra một phân tử sinh học có chức năng duy nhất. Các cầu disulfua (*tức là*, giữa các gốc cystein để tạo ra cystin) có thể có mặt trong một số protein. Các liên kết cộng hóa trị này có thể là ở bên trong một chuỗi polypeptit duy nhất, hoặc ở giữa hai chuỗi polypeptit tách riêng. Ví dụ, cầu disulfua là cần thiết cho cấu trúc và chức năng đúng của insulin, các globulin miễn dịch, protamin, và tương tự. Để có một bài tổng quan gần đây về sự hình thành liên kết disulfua, xem Oka và

Bulleid, “Forming disulfides in the endoplasmic reticulum” 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

Bên cạnh sự hình thành liên kết disulfua, các protein có thể là đối tượng của các cải biến sau dịch mã khác. Các cải biến này bao gồm lipit hóa (ví dụ, myristoyl hóa, palmitoyl hóa, farnesoyl hóa, geranylgeranyl hóa, và sự hình thành glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor), alkyl hóa (ví dụ, metyl hóa), axyl hóa, amin hóa, glycosyl hóa (ví dụ, bổ sung các nhóm glycosyl ở arginin, asparagin, cystein, hydroxylysin, serin, threonin, tyrosin, và/hoặc tryptophan), và phosphoryl hóa (tức là, bổ sung nhóm phosphat vào serin, threonin, tyrosin, và/hoặc histidin). Để có một bài tổng quan gần đây về cải biến sau dịch mã của các protein được tạo ra trong sinh vật nhân thực, xem Mowen và David, “Unconventional post-translational modifications in immunological signaling”, 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); và Blixt và Westerlind, “Arraying the post-translational glycoproteome (PTG),” 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).

Các globulin miễn dịch là các protein mà có nhiều chuỗi polypeptit và nhiều cải biến sau dịch mã. Globulin miễn dịch protein điển hình (ví dụ, IgG) bao gồm bốn chuỗi polypeptit — hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng. Mỗi chuỗi nhẹ được nối với một chuỗi nặng qua liên kết disulfua cystin, và hai chuỗi nặng được nối với nhau qua hai liên kết disulfua cystin. Các globulin miễn dịch được tạo ra trong các hệ thống của động vật có vú cũng được glycosyl hóa ở các gốc khác nhau (ví dụ, ở các gốc asparagin) với các polyxacarit khác nhau, và có thể khác biệt giữa các loài, mà có thể ảnh hưởng đến tính kháng nguyên đối với các kháng thể điều trị (xem Butler và Spearman, “The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering”, 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)).

Khi được sử dụng ở đây, “protein” bao gồm các protein sinh điều trị, các protein tái tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu hoặc trị liệu, các protein bắt giữ và các protein dung hợp Fc khác, các protein khảm, các kháng thể, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể của người, các kháng thể đặc hiệu kép, các mảnh kháng thể, các thể nano, các thể khảm kháng thể tái tổ hợp, các xytokin, các chemokin, các hoocmon peptit, và tương tự. Các protein có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các hệ thống sản xuất từ tế bào tái tổ hợp, như là hệ thống baculovirus từ côn trùng, các hệ thống nấm

men (ví dụ, *Pichia* sp.), các hệ thống từ động vật có vú (ví dụ, các tế bào CHO và các thể biến đổi của CHO như các tế bào CHO-K1). Để có một bài tổng quan gần đây thảo luận về các protein sinh điều trị và việc sản xuất chúng, xem Ghaderi và cộng sự, “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation”, 28 *Biotechnol Genet Eng Rev.* 147-75 (2012).

Thuật ngữ “kháng thể”, khi được sử dụng ở đây, bao gồm các phân tử globulin miễn dịch mà gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng cố định của chuỗi nặng. Vùng cố định của chuỗi nặng gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền, CL. Các vùng VH và VL, ngoài ra, có thể được chia nhỏ hơn thành các vùng siêu biến, được biết với thuật ngữ là các vùng xác định bổ sung (CDR), nằm xen kẽ với các vùng được bảo toàn nhiều hơn, được biết với thuật ngữ là các vùng khung hoạt động (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được bố trí từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (các CDR của chuỗi nặng có thể được viết tắt là HCDR1, HCDR2 và HCDR3; các CDR của chuỗi nhẹ có thể được viết tắt là LCDR1, LCDR2 và LCDR3. Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” để chỉ các kháng thể mà có ái lực liên kết với đích của chúng ít nhất là 10^{-9} M, ít nhất là 10^{-10} M; ít nhất là 10^{-11} M; hoặc ít nhất là 10^{-12} M, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™ hoặc ELISA ái lực-dung dịch.

Cụm từ “kháng thể đặc hiệu kép” bao gồm kháng thể có khả năng liên kết chọn lọc với hai hoặc nhiều quyết định kháng nguyên. Các kháng thể đặc hiệu kép thường là bao gồm chuỗi nặng khác nhau, với mỗi chuỗi nặng liên kết đặc hiệu với một quyết định kháng nguyên khác nhau—trên hai phân tử (ví dụ, các kháng nguyên) khác nhau hoặc trên cùng một phân tử (ví dụ, trên cùng một kháng nguyên). Nếu kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết chọn lọc với hai quyết định kháng nguyên khác nhau (quyết định kháng nguyên thứ nhất và quyết định kháng nguyên thứ hai), ái lực của chuỗi nặng thứ nhất đối với quyết định kháng nguyên thứ nhất thường sẽ là thấp hơn ít nhất mười mũ một đến hai hoặc ba hoặc bốn lần so với ái lực của chuỗi nặng thứ nhất đối với quyết định kháng nguyên thứ hai, và ngược lại. Các quyết định kháng nguyên

được nhận biết bởi kháng thể đặc hiệu kép có thể trên cùng một đích hoặc trên đích khác nhau (ví dụ, trên cùng một protein hoặc trên protein khác nhau). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách kết hợp các chuỗi nặng nhận biết các quyết định kháng nguyên khác nhau của cùng một kháng nguyên. Ví dụ, các trình tự axit nucleic mã hóa các trình tự biến đổi của chuỗi nặng mà nhận biết các quyết định kháng nguyên khác nhau của cùng một kháng nguyên có thể được dung hợp với các trình tự axit nucleic mã hóa các vùng cố định của chuỗi nặng khác nhau, và các trình tự này có thể được biểu hiện trong tế bào mà biểu hiện chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Kháng thể đặc hiệu kép điển hình có hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi nặng có ba CDR của chuỗi nặng, theo sau bởi (từ đầu N đến đầu C) miền CH1, vùng bản lề, miền CH2, và miền CH3, miền, và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch mà không mang đến tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên nhưng có thể kết hợp với mỗi chuỗi nặng, hoặc có thể liên kết với một hoặc nhiều quyết định kháng nguyên trong số các quyết định kháng nguyên được liên kết bởi các vùng liên kết kháng nguyên của chuỗi nặng, hoặc có thể kết hợp với mỗi chuỗi nặng và cho phép gắn kết một hoặc cả hai chuỗi nặng với một hoặc cả hai quyết định kháng nguyên.

Cụm từ “chuỗi nặng”, hoặc “chuỗi nặng của globulin miễn dịch” bao gồm trình tự vùng cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch từ sinh vật bất kỳ, và trừ trường hợp điều khác được quy định cụ thể, bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng. Các miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm ba CDR của chuỗi nặng và bốn vùng FR, trừ trường hợp điều khác được quy định cụ thể. Các mảnh của các chuỗi nặng bao gồm các CDR, các CDR và các FR, và các tổ hợp của chúng. Chuỗi nặng điển hình có, theo sau miền biến đổi (từ đầu N đến đầu C), miền CH1, vùng bản lề, miền CH2, và miền CH3. Mảnh chức năng của chuỗi nặng bao gồm mảnh mà có khả năng nhận biết đặc hiệu kháng nguyên (ví dụ, nhận biết kháng nguyên với KD nằm trong khoảng micromol, nanomol, hoặc picomol), tức là khả năng biểu hiện và tiết từ tế bào, và bao gồm ít nhất một CDR.

Cụm từ “chuỗi nhẹ” bao gồm trình tự vùng cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch từ sinh vật bất kỳ, và trừ trường hợp điều khác được quy định cụ thể, bao gồm các chuỗi nhẹ kappa và lambda của người. Các miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) điển hình là bao gồm ba CDR của chuỗi nhẹ CDR và bốn vùng khung hoạt động (FR), trừ trường hợp điều khác được quy định cụ thể. Nhìn chung, chuỗi nhẹ có chiều dài

đầy đủ bao gồm, từ đầu amino đến đầu cacboxyl, miền VL mà bao gồm FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, và miền cố định của chuỗi nhẹ. Các chuỗi nhẹ mà có thể được sử dụng cho sáng chế bao gồm *ví dụ*, các chuỗi nhẹ, mà không liên kết chọn lọc với kháng nguyên thứ nhất hay với kháng nguyên thứ hai mà đã được liên kết chọn lọc bởi protein liên kết kháng nguyên. Các chuỗi nhẹ thích hợp bao gồm các chuỗi nhẹ mà có thể được nhận diện bằng cách sàng lọc Các chuỗi nhẹ được sử dụng phổ biến nhất trong các thư viện kháng thể hiện có (các thư viện ướt hoặc *in silico*), mà ở đó các chuỗi nhẹ này về cơ bản là không gây cản trở ái lực và/hoặc tính chọn lọc của các miền liên kết kháng nguyên của các protein liên kết kháng nguyên. Các chuỗi nhẹ thích hợp bao gồm các chuỗi nhẹ mà có thể liên kết với một hoặc cả hai quyết định kháng nguyên mà đã được gắn kết bởi các vùng liên kết kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên.

Cụm từ “miền biến đổi” bao gồm trình tự axin amin của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (được thay đổi tùy ý) mà bao gồm các vùng axit amin sau, theo thứ tự từ đầu N đến đầu C (nếu không có chỉ thị khác): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. “Miền biến đổi” bao gồm trình tự axin amin có khả năng cuộn gấp thành miền chuẩn (VH hoặc VL) mà có cấu trúc tấm beta đôi trong đó các tấm beta được nối bởi liên kết disulfua giữa gốc liên kết của tấm beta thứ nhất và tấm beta thứ hai.

Cụm từ “vùng xác định bổ sung”, hoặc thuật ngữ “CDR,” bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic của các gen globulin miễn dịch của sinh vật mà bình thường là (*tức là*, trong động vật kiểu đại) xuất hiện giữa hai vùng khung hoạt động trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch (*ví dụ*, kháng thể hoặc thụ thể tế bào T). CDR có thể được mã hóa bởi, *ví dụ*, a trình tự dòng mầm hoặc trình tự được sắp xếp lại hoặc không được sắp xếp lại, và, *ví dụ*, bởi tế bào B hoặc tế bào T nguyên bản (naive) hoặc trưởng thành. Trong một số trường hợp (*ví dụ*, đối với CDR3), các CDR có thể được mã hóa bởi hai hoặc nhiều trình tự (*ví dụ*, các trình tự dòng mầm) không liên kế (*ví dụ*, trong trình tự axit nucleic không được sắp xếp lại) nhưng liên kế trong trình tự axit nucleic của tế bào B, *ví dụ*, là kết quả của việc ghép nối hoặc liên kết các trình tự này (*ví dụ*, tái tổ hợp V-D-J để tạo ra CDR3 của chuỗi nặng).

Thuật ngữ “mảnh kháng thể”, để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Các ví dụ về các mảnh gắn kết được hàm chứa bên trong thuật ngữ “mảnh kháng thể” bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được nối bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd bao gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv bao gồm các miền VL và VH của một chuỗi đơn của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward và cộng sự (1989) Nature 241:544-546), mà bao gồm miền VH, (vi) CDR được phân lập, và (vii) scFv, mà bao gồm hai miền gồm mảnh Fv, VL và VH, được nối bởi phần tử nối tổng hợp để tạo ra một chuỗi protein đơn mà trong đó các vùng VL và VH ghép cặp để tạo ra các phân tử hóa trị một. Các dạng khác của các kháng thể đơn chuỗi, như là các thể hai cũng được hàm chứa trong thuật ngữ “kháng thể” (xem ví dụ, Holliger và cộng sự (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak và cộng sự (1994) Structure 2:1121-1123).

Cụm từ “protein chứa Fc” bao gồm các kháng thể, các kháng thể đặc hiệu kép, các phân tử dinh miễn dịch, và các protein gắn kết khác mà chứa ít nhất là phần chức năng của vùng CH2 và CH3 globulin miễn dịch. “Phần chức năng” để chỉ đến vùng CH2 và CH3 mà có thể liên kết với thụ thể Fc (ví dụ, FcγR; hoặc FcRn, tức là, thụ thể Fc mới được tạo ra), và/hoặc cái mà có thể tham gia vào sự hoạt hóa bổ thể. Nếu vùng CH2 và CH3 chứa các thay đổi xóa, thay thế và/hoặc chèn hoặc các thay đổi khác mà khiến nó không có khả năng liên kết với thụ thể Fc bất kỳ và cũng không có khả năng hoạt hóa bổ thể, vùng CH2 và CH3 này không có chức năng.

Các protein chứa Fc có thể bao gồm các thay đổi trong các miền globulin miễn dịch, bao gồm trong đó các thay đổi ảnh hưởng đến một hoặc nhiều chức năng của phân tử tác động của protein gắn kết (ví dụ, các thay đổi ảnh hưởng đến sự gắn kết FcγR, sự gắn kết FcRn, và do đó, ảnh hưởng đến chu kỳ phân rã, và/hoặc hoạt tính CDC). Các thay đổi này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các thay đổi và các tổ hợp thay đổi sau, có tham chiếu đến cách đánh số EU cho vùng cố định globulin miễn dịch: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373,

375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, và 439.

Ví dụ, và không theo cách tạo giới hạn, protein gắn kết là protein chứa Fc và thể hiện chu kỳ bán rã trong huyết thanh được tăng cường (khi được so sánh với protein chứa Fc cùng loại mà không có (các) thay đổi nêu trên và có sự thay đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc thay đổi ở 428 và/hoặc 433 (ví dụ, L/R/SI/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc Y); hoặc thay đổi ở 250 và/hoặc 428; hoặc thay đổi ở 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một ví dụ khác, sự thay đổi này có thể bao gồm sự thay đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); sự thay đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và sự thay đổi 308F (ví dụ, V308F); sự thay đổi 433K (ví dụ, H433K) và sự thay đổi 434 (ví dụ, 434Y); sự thay đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); sự thay đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); sự thay đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Thuật ngữ “protein liên kết kháng nguyên,” khi được sử dụng ở đây, để chỉ polypeptit hoặc protein (một hoặc nhiều polypeptit được tạo phức trong đơn vị chức năng) mà nhận biết đặc hiệu quyết định kháng nguyên trên kháng nguyên, như là kháng nguyên đặc hiệu tế bào và/hoặc kháng nguyên đích theo sáng chế. Protein liên kết kháng nguyên có thể là đa đặc hiệu. Thuật ngữ “đa đặc hiệu” khi dùng trong trường hợp của protein liên kết kháng nguyên có nghĩa là protein này nhận biết các quyết định kháng nguyên khác nhau, trên cùng một kháng nguyên hoặc trên các kháng nguyên khác nhau. Protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu protein theo sáng chế có thể là một polypeptit đa chức năng đơn, hoặc nó có thể là phức nhiều thành phần (multimer) của hai hoặc nhiều polypeptit mà được kết hợp cộng hóa trị không cộng hóa trị với polypeptit khác. Thuật ngữ “protein liên kết kháng nguyên” bao gồm kháng thể hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế mà có thể được nối hoặc được đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể có thể được liên kết về chức năng (ví dụ, bằng cách tạo cặp hóa học, dung hợp di truyền, kết hợp không cộng hóa trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều gốc phân tử khác, như là protein hoặc mảnh protein để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên hai đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu với tính đặc hiệu gắn kết thứ hai.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” để chỉ đến phần của kháng nguyên mà được nhận biết bởi polypeptit liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu. Kháng nguyên đơn (như là polypeptit của kháng nguyên) có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Các quyết định kháng nguyên có thể được xác định là quyết định kháng nguyên cấu trúc hoặc quyết định kháng nguyên chức năng. Các quyết định kháng nguyên cấu trúc thường là tập hợp con của các quyết định kháng nguyên cấu trúc và được xác định là các gốc quyết định kháng nguyên cấu trúc mà góp phần trực tiếp vào ái lực của sự tương tác giữa polypeptit liên kết kháng nguyên và kháng nguyên. Các quyết định kháng nguyên cũng có thể là các quyết định kháng nguyên cấu dạng, tức là, bao gồm các axit amin không ở dạng mạch thẳng. Theo các phương án nhất định, các quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các yếu tố quyết định mà là các nhóm es may bao gồm các nhóm hoạt động bề mặt hóa học gồm các phân tử như là các axit amin, các chuỗi bên đường, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu và/hoặc các đặc tính điện tích đặc hiệu. Các quyết định kháng nguyên được tạo ra từ các axit amin liên kế thường là được giữ để tiếp xúc với các dung môi biến tính, trong khi các quyết định kháng nguyên được tạo ra sự cuộn gấp bậc ba thường là bị mất trong quá trình xử lý bằng các dung môi biến tính.

Thuật ngữ “miền” để chỉ đến phần bất kỳ của một protein hoặc polypeptit mà có chức năng hoặc cấu trúc cụ thể. Tốt hơn là, các miền theo sáng chế gắn kết với các kháng nguyên đặc hiệu tế bào hoặc các kháng nguyên đích. Các kháng nguyên đặc hiệu tế bào hoặc các kháng nguyên đích, và tương tự, khi được sử dụng ở đây, bao gồm bất kỳ polypeptit hoặc glycoprotein xuất hiện tự nhiên, có thể thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được thiết kế di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên.

Thuật ngữ “bán kháng thể” hoặc “nửa kháng thể”, được sử dụng thay thế cho nhau, để chỉ đến bán phần của kháng thể, mà về cơ bản là chứa một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ. Các chuỗi nặng của kháng thể có thể tạo ra các dime, do đó chuỗi nặng của một nửa kháng thể có thể nối với chuỗi nặng đã được nối với một phân tử khác (ví dụ, một nửa kháng thể khác) hoặc một polypeptit chứa Fc khác. Hai miền Fc hơi khác nhau có thể “dị dime hóa” như trong sự tạo thành các kháng thể đặc hiệu kép hoặc các dị dime, dị trime, dị tetrame, và tương tự. Xem Vincent và 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); và Shimamoto và cộng sự, “Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies”, 4(5) MAbs 586-91 (2012).

Theo một phương án, miền biến đổi của nửa kháng thể nhận biết đặc hiệu yếu tố tác động nội bào hóa và miền Fc của nửa kháng thể tạo thành dime với protein dung hợp Fc mà chứa enzym thay thế (ví dụ, peptibody) Id, 586.

“Alpha-glucosidaza” (hoặc “ α -glucosidaza”), “hoạt tính α -glucosidaza”, “GAA”, và “hoạt tính GAA” được sử dụng thay thế lẫn nhau và dùng để chỉ protein bất kỳ mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc thủy phân các liên kết 1,4- α của glycogen và tinh bột thành glucoza. GAA còn được biết đến ví dụ, là EC 3.2.1.20, maltaza, glucoinvertaza, glucosidosucraza, maltaza-glucoamylaza, alpha-glucopyranosidaza, glucosidoinvertaza, alpha-D-glucosidaza, alpha-glucosit hydrolaza, alpha-1,4-glucosidaza, và alpha-D-glucosit glucohydrolaza. GAA có thể được tìm thấy trong lyzom và ở phần gờ bàn chải của ruột non. Các bệnh nhân mắc bệnh Pompe thiếu α -glucosidaza lyzom có chức năng. Xem S. Chiba, “Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase”, 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); và Hesselink và cộng sự, “Lyzosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II”, 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003).

“Alpha-galactosidaza A” (hoặc “ α -galactosidaza A”), “hoạt tính α -galactosidaza A”, “ α -galactosidaza”, “hoạt tính α -galactosidaza”, “GLA”, và “hoạt tính GLA” được sử dụng thay thế lẫn nhau và dùng để chỉ protein bất kỳ mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc thủy phân các gốc đầu α -galactosyl từ các glycolipit và các glycoprotein, và ngoài ra thủy phân các α -D-fucosit. GLA còn được biết đến ví dụ, là EC 3.2.1.22, melibiaza, α -D-galactosidaza, α -galactosidaza A, α -galactosit galactohydrolaza, α -D-galactosit galactohydrolaza. GLA là enzym lyzom được mã hóa bởi gen GLA liên kết với X. Các khuyết tật trong GLA có thể dẫn đến bệnh Fabry, trong đó glycolipit được biết đến là globotriaosylceramit (a.k.a. Gb3, GL-3, hoặc ceramit trihexosit) tích tụ bên trong các mạch máu (tức là, bệnh lý mạch máu nổi lên), gây đau và làm giảm chức năng của thận, tim, da và/hoặc các mô thuộc mạch máu não, và các mô, và cơ quan khác. Xem, ví dụ, Prabakaran và cộng sự “Mannose 6-phosphate receptor and sortilin

mediated endocytosis of α -galactosidase A in kidney endothelial cells,” 7(6) PLoS One e39975, các trang từ 1-9 (2012).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân (hoặc đối tượng) mắc bệnh tích trữ trong lysosom (LSD) bằng việc cho bệnh nhân này dùng “phức hợp trị liệu sinh học”. Phức hợp trị liệu sinh học đi vào trong các tế bào của bệnh nhân và vận chuyển đến các lysosom một enzym hoặc hoạt tính enzym (tức là, “enzym thay thế”) mà thay thế enzym hoặc hoạt tính enzym mà đi kèm theo LSD (tức là, “enzym nội sinh”).

Các LSD bao gồm các rối loạn chuyển hóa sphingolipit, các rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit, và các bệnh liên quan đến tích trữ glycogen. Theo một số phương án, LSD một hoặc nhiều bệnh bất kỳ trong số bệnh Fabry, bệnh Gaucher typ I, bệnh Gaucher typ II, bệnh Gaucher typ III, bệnh Niemann-Pick typ A, bệnh Niemann-Pick typ B, rối loạn chuyển hóa GM1-gangliosit, bệnh Sandhoff, bệnh Tay-Sachs, chứng thiếu hụt chất hoạt hóa GM2, chứng rối loạn do tích tụ gangliosit-GM3, loạn dưỡng bạch cầu biến sắc, chứng thiếu hụt chất hoạt hóa sphingolipit, bệnh Scheie, bệnh Hurler-Scheie, bệnh Hurler, bệnh Hunter, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, hội chứng Morquio A, hội chứng Morquio B, bệnh Maroteaux-Lamy, bệnh Sly, MPS IX, và bệnh Pompe. Theo một phương án cụ thể, LSD là bệnh Fabry. Theo một phương án khác, LSD là bệnh Pompe.

Theo một số phương án, phức hợp trị liệu sinh học chứa (a) enzym thay thế, và (b) gốc phân tử mà gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa. Trong một số trường hợp, enzym thay thế một hoặc nhiều enzym bất kỳ trong số α -galactosidaza, β -galactosidaza, α -glucosidaza, β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, ceramidaza, sphingomyelinaza, β -hexosaminidaza, chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arylsulfataza, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparin *N*-sulfataza, *N*-acetyl- α -glucosaminidaza, α -glucosamin *N*-acetyltransferaza, *N*-acetylglucosamin-6-sulfataza, *N*-acetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, *N*-acetylgalactosamin-4-sulfataza, β -glucuronidaza, và hyaluronidaza.

Trong một số trường hợp, bệnh nhân có thể không tạo ra đủ protein sao cho enzym thay thế bị nhận biết bởi bệnh nhân này như là “không phải của bản thân bệnh nhân” và phản ứng miễn dịch xảy ra sau khi dùng enzym thay thế. Điều này không

phải là điều được mong muốn. Do đó, theo một số phương án, enzym thay thế được thiết kế hoặc được tạo ra theo cách sao cho tránh cảm ứng phản ứng miễn dịch ở đối tượng. Một giải pháp như vậy là sử dụng “isozym” như là enzym thay thế. Isozym ở mức độ đủ gần với protein “của bản thân” bệnh nhân, nhưng có hoạt tính enzym thay thế đủ để làm giảm nhẹ các triệu chứng của LSD.

Theo một phương án cụ thể, trong đó LSD là bệnh Pompe và enzym nội sinh là α -glucosidaza (GAA), isozym này có thể là bất kỳ enzym nào trong số axit α -glucosidaza, sucraza-isomaltaza (SI), maltaza-glucoamylaza (MGAM), glucosidaza II (GANAB), và α -glucosidaza trung hòa (C GNAC). Theo một phương án cụ thể khác, trong đó LSD là bệnh Fabry và enzym nội sinh là α -galactosidaza A (GLA), isozym này có thể là α -N-axetyl galactosaminidaza được thiết kế để có hoạt tính GLA.

Phức trị liệu sinh học có thành phần protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa mà cho phép việc thu nhận enzym thay thế vào trong tế bào. Do đó, theo một số phương án, yếu tố tác động nội bào hóa có thể là CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, thụ thể transferrin, thụ thể LDL, thụ thể protein 1 có liên quan LDL, ASGR1, ASGR2, protein giống protein tiền phân tử amyloid 2 (APLP2), thụ thể apelin (APLNR), PRLR (thụ thể prolactin), MAL (protein Myelin và tế bào lympho, a.k.a. VIP17), IGF2R, ATPaza loại H⁺ thuộc không bào, thụ thể chất độc bệnh bạch hầu, thụ thể folat, các thụ thể glutamat, thụ thể glutathion, thụ thể leptin, thụ thể dọn dẹp, SCARA1-5, SCARB1-3, và CD36. Theo các phương án nhất định, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu thận, như là CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (thụ thể hormone parathyroid), SLC22A13 (thành viên 13 của họ chất mang chất tan 22), SLC5A2 (chất đồng vận chuyển natri/glucose 2), và UMOD (Uromodulin). Theo các phương án nhất định khác, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu cơ, như là BMPR1A (thụ thể 1A của protein phát sinh hình thái xương), m-cadherin, CD9, MuSK (kinaza đặc hiệu cơ), LGR4/GPR48 (thụ thể 48 được ghép cặp protein G), thụ thể cholin (nicotin) alpha 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (Integrin alpha-7), CACNG1 (tiểu phần gamma-1 của kênh canxi loại L), CACNA1S (tiểu phần alpha-15 của kênh canxi loại L), CACNG6 (tiểu phần gamma-6 của kênh canxi loại L), SCN1B (tiểu phần beta-1 của kênh natri), CHRNA1 (tiểu phần alpha của thụ thể ACh), CHRND (tiểu phần delta của thụ thể ACh), LRRC14B (protein chứa các đơn vị lặp giàu leucine 14B), và POPDC3 (protein chứa miền Popeye

3). Theo một số phương án cụ thể, yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CD9, CD63, APLP2, hoặc PRLR.

Theo một số phương án, protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa bao gồm protein liên kết kháng nguyên, mà bao gồm ví dụ phân tử dung hợp-thụ thể, phân tử bắt giữ, phân tử dung hợp Fc-thụ thể, kháng thể, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fd, mảnh Fv, phân tử Fv đơn chuỗi (scFv), mảnh dAb, vùng xác định bổ sung (CDR) được phân lập, peptit CDR3, peptit FR3-CDR3-FR4 được nối ràng buộc, kháng thể đặc hiệu miền, kháng thể đơn miền, kháng thể xóa miền, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể nhỏ, thể nano, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, được phẩm miễn dịch chất điều biến nhỏ (SMIP), kháng thể lạc đà (kháng thể đồng dime của chuỗi nặng VHH), và miền IgNAR biến đổi của cá mập.

Theo một phương án, gốc phân tử mà gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa là kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc protein liên kết kháng nguyên khác. Ví dụ, gốc phân tử này có thể là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó một chi gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa (ví dụ, ITGA7, CD9, CD63, PRLR, APLP2), và chi còn lại gắn kết với enzym thay thế. Ở đây, phức hợp trị liệu sinh học chứa kháng thể đặc hiệu kép và enzym thay thế (Fig. 1A). Theo một phương án cụ thể, bệnh được điều trị là bệnh Fabry, và phức hợp trị liệu sinh học chứa GLA và kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết với GLA và CD63. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh được điều trị là bệnh Pompe, và phức hợp trị liệu sinh học chứa GAA và kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết với GAA và CD63.

Theo một phương án khác, gốc phân tử mà gắn kết với yếu tố tác động nội bào hóa bao gồm nửa kháng thể, và enzym thay thế chứa miền Fc (polypeptit dung hợp Fc-enzym). Theo một phương án, miền Fc của polypeptit dung hợp Fc-enzym kết hợp với miền Fc của nửa kháng thể đặc hiệu yếu tố tác động nội bào hóa để tạo ra phức hợp trị liệu sinh học (Fig. 1B).

Theo các phương án khác, enzym thay thế được liên kết cộng hóa trị với protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa. Phương án dung hợp nửa kháng thể: dung hợp Fc-enzym được nêu trong đoạn trên (cũng xem trong Fig. 1B) thuộc vào loại này, do dime Fc có thể được giữ chắc qua một hoặc nhiều cầu disulfua. Liên kết cộng hóa trị giữa miền hoặc polypeptit có hoạt tính enzym và miền hoặc polypeptit gắn kết -nội hóa có

thể là loại bất kỳ trong số các loại liên kết cộng hóa trị, *tức là*, liên kết bất kỳ mà liên quan đến việc cho nhận các điện tử. Trong một số trường hợp, liên kết cộng hóa trị là liên kết peptit giữa hai axit amin, sao cho toàn bộ hoặc một phần của enzym thay thế và protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa tạo ra chuỗi polypeptit liên tục, như trong protein dung hợp. Trong một số trường hợp, phần enzym thay thế và protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa được nối trực tiếp. Trong các trường hợp khác, phần tử nối được sử dụng để buộc nối hai phần này. Xem Chen và cộng sự, "Fusion protein linkers: property, design and functionality", 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013).

Theo một phương án cụ thể, enzym thay thế được liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nặng của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa (xem Fig. 1C) hoặc với đầu C của chuỗi nhẹ (Fig. 1E). Theo một phương án cụ thể khác, enzym thay thế được liên kết cộng hóa trị với đầu N của chuỗi nặng của kháng thể kháng yếu tố tác động nội bào hóa (xem Fig. 1D) hoặc với đầu N của chuỗi nhẹ (Fig. 1F).

Trong một số trường hợp, đặc biệt là trong đó enzym thay thế không được xử lý theo cách phân giải protein cách bình thường trong lysosom, phần tử nối phân cắt được, được thêm vào các phương án về phức hợp trị liệu sinh học này sao cho bao gồm sự dung hợp kháng thể-enzym. Theo một số phương án, phần tử nối phân cắt được bằng cathepsin được chèn vào giữa kháng thể và enzym thay thế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc loại bỏ kháng thể trong lysosom để a) có thể giúp bảo toàn hoạt tính enzym bằng cách loại bỏ kháng thể lớn về không gian và b) có thể tăng chu kỳ bán rã trong lysosom của enzym.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm hoạt tính enzym và protein liên kết kháng nguyên, trong đó enzym này liên quan đến bệnh tích trữ trong lysosom (LSD) và protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa. Các enzym (mà bao gồm các protein mà về bản chất không phải là chất xúc tác) liên quan đến các bệnh tích trữ trong lysosom bao gồm ví dụ α -galactosidaza, β -galactosidaza, α -glucosidaza, β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, ceramidaza, sphingomyelinaza, β -hexosaminidaza, chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arylsulfataza, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparin *N*-sulfataza, *N*-axetyl- α -glucosaminidaza, α -glucosamit *N*-axetyltransferaza, *N*-axetylglucosamin-6-sulfataza,

N-axetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, *N*-axetylgalactosamin-4-sulfataza, β -glucuronidaza, hyaluronidaza, và tương tự.

Các protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa, ví dụ, bao gồm phân tử dung hợp-thụ thể, phân tử bắt giữ, phân tử dung hợp Fc-thụ thể, kháng thể, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fd, mảnh Fv, phân tử Fv đơn chuỗi (scFv), mảnh dAb, vùng xác định bổ sung (CDR) được phân lập, peptit CDR3, peptit FR3-CDR3-FR4 được nối ràng buộc, kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể đơn miễn, kháng thể xóa miễn, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể nhỏ, thể nano, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, dược phẩm miễn dịch chất điều biến nhỏ (SMIP), kháng thể lạc đà (kháng thể đồng dime của chuỗi nặng VHH), và miền IgNAR biến đổi của cá mập, các protein liên kết kháng nguyên khác, và tương tự.

Các yếu tố tác động nội bào hóa bao gồm, ví dụ CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, thụ thể transferrin, thụ thể LDL, thụ thể protein 1 có liên quan-LDL, ASGR1, ASGR2, protein giống protein tiền phân tử amyloid 2 (APLP2), thụ thể apelin (APLNR), PRLR (thụ thể prolactin), MAL (protein Myelin và tế bào lympho, a.k.a. VIP17), IGF2R, ATPaza loại H⁺ thuộc không bào, thụ thể chất độc bệnh bạch hầu, thụ thể folat, các thụ thể glutamat, thụ thể glutathion, thụ thể leptin, thụ thể dọn dẹp, SCARA1-5, SCARB1-3, và CD36. Theo các phương án nhất định, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu thận, như là CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (thụ thể hormone parathyroid), SLC22A13 (thành viên 13 của họ chất mang chất tan 22), SLC5A2 (chất đồng vận chuyển natri/glucose 2), và UMOD (Uromodulin). Theo các phương án nhất định khác, yếu tố tác động nội bào hóa là chất nội hóa đặc hiệu cơ, như là BMPRI1A (thụ thể 1A của protein phát sinh hình thái xương), m-cadherin, CD9, MuSK (kinaza đặc hiệu cơ), LGR4/GPR48 (thụ thể 48 được ghép cặp protein G), thụ thể cholin (nicotin) alpha 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (Integrin alpha-7), CACNG1 (tiểu phần gamma-1 của kênh canxi loại L), CACNA1S (tiểu phần alpha-15 của kênh canxi loại L), CACNG6 (tiểu phần gamma-6 của kênh canxi loại L), SCN1B (tiểu phần beta-1 của kênh natri), CHRNA1 (tiểu phần alpha của thụ thể ACh), CHRND (tiểu phần delta của thụ thể ACh), LRRC14B (protein chứa các đơn vị lặp giàu leucine 14B), và POPDC3 (protein chứa miền Popeye 3). Trong một số phương án cụ thể, yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CD9, CD63, ALPL2, hoặc PPRLR.

Theo một số phương án, enzym được liên kết cộng hóa trị (*tức là*, các điện tử được chia sẻ qua các nguyên tử) với protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể, protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa bao gồm hoặc chứa nửa kháng thể; enzym được dung hợp với miền dung hợp Fc (*ví dụ*, ở đầu C); và miền Fc mà được liên kết cộng hóa trị với enzym kết hợp với miền Fc của protein liên kết kháng nguyên, sao cho sự kết hợp chứa một hoặc nhiều cầu disulfua. Phương án cụ thể này được mô tả bằng giản đồ trong Fig. 1B.

Theo một phương án cụ thể khác, protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa (IE- BP) bao gồm hoặc chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và enzym được liên kết cộng hóa trị với kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Theo một phương án cụ thể, IEBP là kháng thể, và enzym là liên kết cộng hóa trị (trực tiếp qua liên kết peptit, hoặc gián tiếp qua phân tử nối) với đầu C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể (Fig. 1C hoặc 1E, tương ứng). Theo một phương án cụ thể khác, IEBP là kháng thể, và enzym là liên kết cộng hóa trị (trực tiếp qua liên kết peptit, hoặc gián tiếp qua phân tử nối) với đầu N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể (Fig. 1D hoặc 1F, tương ứng).

Theo một số phương án, enzym và IEBP không được liên kết cộng hóa trị, nhưng được kết hợp trong hỗn hợp trộn. IEBP và enzym có thể kết hợp qua các lực không cộng hóa trị để tạo ra phức. Ví dụ, theo một phương án cụ thể, IEBP là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó một bên cánh thay của kháng thể gắn với yếu tố tác động nội bào hóa và cánh tay còn lại gắn với enzym. Phương án này được mô tả bằng giản đồ trong Fig. 1A.

Theo một số phương án, enzym là GAA hoặc có hoạt tính GAA (*ví dụ*, isozym có hoạt tính GAA), và yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CDH15, CD9, CD63, APLP2, hoặc PRLR. Theo một phương án cụ thể, enzym là GAA hoặc có hoạt tính GAA, miền nội hóa là CD63, và IEBP là kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu đôi với CD63 và GAA.

Theo một số phương án, enzym là GLA hoặc có hoạt tính GLA (*ví dụ*, isozym có hoạt tính GAA), và yếu tố tác động nội bào hóa là ITGA7, CD9, CD63, APLP2, hoặc PRLR. Theo một phương án cụ thể, enzym là GLA hoặc có hoạt tính GLA, miền

nội hóa là CD63, và IEBP là kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu đối với CD63 và GLA.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc hoặc sàng lọc phức hợp trị liệu sinh học mà chứa enzym và protein liên kết kháng nguyên mà thay thế có hiệu quả enzym ở bệnh nhân cần điều trị. Theo một phương án, phức hợp trị liệu sinh học được sử dụng cho hệ thống mô hình và hệ thống mô hình này được đánh giá về hoạt tính enzym được thay thế. Theo một phương án, hệ thống mô hình này là động vật mà thiếu sự biểu hiện enzym và biểu hiện kháng nguyên cùng gốc của protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, mô hình động vật này là chuột mà biểu hiện kháng nguyên cùng gốc được làm giống với của người của protein liên kết kháng nguyên và với sự bất hoạt (knock-out) gen mã hóa enzym này.

Theo một phương án, chuột chứa bản sao bất hoạt của enzym lysosom như là α -galactosidaza A, Ceramidaza, β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, sphingomyelinaza, β -galactosidaza, β -hexosaminidaza A và B, β -Hexosaminidaza A và B, β -Hexosaminidaza A, protein chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arylsulfataza A, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparan N-sulphataza, N-acetyl- α -glucosaminidaza, Acetyl-CoA; α -glucosamit N-acetyltransferaza, N-acetylglucosamin-6-sulfataza, N-acetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, β -Galactosidaza, N-acetylgalactosamin-4-sulfataza (arylsulphataza B), β -glucuronidaza, hyaluronidaza, α -Glucosidaza 2 hoặc lipaza axit lysosomal. Theo một phương án, chuột bất hoạt (knock-out) cũng biểu hiện bản sao của người hoặc bản sao được làm giống với của người của yếu tố tác động nội bào hóa (*tức là*, bản sao có chung gốc với protein liên kết kháng nguyên). Các yếu tố tác động nội bào hóa của người bao gồm CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, thụ thể transferrin, thụ thể LDL, thụ thể protein có liên quan-LDL 1, ASGR1, ASGR2, protein giống protein tiền phân tử amyloid 2 (APLP2), thụ thể apelin (APLNR), PRLR (thụ thể prolactin), MAL (protein Myelin và tế bào lympho, a.k.a. VIP17), IGF2R, ATPaza loại H⁺ thuộc không bào, thụ thể chất độc bệnh bạch hầu, thụ thể folat, các thụ thể glutamat, thụ thể glutathion, thụ thể leptin, thụ thể dọn dẹp, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36, CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (thụ thể hormon parathyroid), SLC22A13 (thành viên 13 của họ chất mang chất tan 22), SLC5A2 (chất đồng vận chuyển natri/glucoza 2), UMOD (Uromodulin), BMPRI1A

(thụ thể protein phát sinh hình thái xương 1A), M-cadherin, CD9, MuSK (kinaza đặc hiệu cơ), LGR4/GPR48 (thụ thể ghép cặp protein G 48), thụ thể cholin (nicotin) alpha 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (Integrin alpha-7), CACNG1 (tiểu phần của kênh canxi loại L gamma-1), CACNA1S (tiểu phần của kênh canxi loại L alpha-15), CACNG6 (tiểu phần của kênh canxi loại L gamma-6), SCN1B (tiểu phần của kênh natri beta-1), CHRNA1 (tiểu phần alpha của thụ thể ACh), CHRND (tiểu phần delta của thụ thể ACh), LRRC14B (protein chứa các đơn vị lặp giàu leuxin 14B), và POPDC3 (protein chứa miền Popeye 3).

Các phương pháp tạo ra chuột biểu hiện các thụ thể của người đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem ví dụ Ma và cộng sự, *Drug Metab. Dispos.* tháng mười hai năm 2008; 36(12):2506-12; và Patent Mỹ số 8,878,001 B2, mà được kết hợp trong bản mô tả này về chuột chuyển gen biểu hiện các thụ thể của người. Các phương pháp tạo ra chuột bất hoạt (knock-out) enzym cũng đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem ví dụ Kuemmel và cộng sự, *Pathol. Res. Pract.* 1997;193(10):663-71, mà được kết hợp trong bản mô tả này về chuột bất hoạt enzym liên quan đến tích trữ trong lyzom.

Các ví dụ sau được thực hiện để minh họa rõ hơn các phương pháp theo sáng chế. Các ví dụ này chỉ là để minh họa và không được chủ định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Protein dung hợp α -Glucosidaza lyzom

Các hệ thống vận chuyển được hướng dẫn bởi kháng thể không phụ thuộc vào CI-MPR được thiết kế để vận chuyển enzym đến lyzom. Bảng 3 liệt kê các cấu trúc phân tử, cùng với mức độ biểu hiện của chúng trong các tế bào CHO (xem Fig. 2), hoạt tính GAA ước tính như được xác định bằng cách sử dụng cơ chất huỳnh quang 4-methylumbelliferyl- α -glucosit (xem Fig. 3), và nhắm đích lyzom, nội hóa, và tình trạng hoạt tính (xem các hình vẽ Fig. 4 và Fig. 5).

Ví dụ 2: Nội hóa cấu trúc GAA

Việc nội hóa các cấu trúc GAA được xác định bằng cách đo hoạt tính enzym trong dịch ly giải tế bào. Các cấu trúc khác nhau của GAA tái tổ hợp (SEQ ID NO:1) được thêm vào HEK293, nguyên bào cơ xương của người (Lonza, Walkersville, MD), hoặc nguyên bào cơ của chuột C2C12. Các tế bào được trải trong các đĩa 24 giếng 24 giờ trước khi bổ sung các cấu trúc enzym. Các cấu trúc enzym được thêm vào môi trường của tế bào trong 18 giờ. Sau đó, các tế bào được rửa sạch trong PBS được làm lạnh bằng đá và được ly giải trong NP-40 0,5% được làm lạnh bằng đá trong đệm thử nghiệm (natri axetat 0,2 M, kali clorua 0,4 M, pH= 4,3). Dịch ly giải được ly tâm ở tốc độ 15.000 x g trong 15 phút ở 4°C và dịch nổi được ủ bằng 4-metylumbelliferyl alpha-D-glucosit, cơ chất GAA, trong đệm thử nghiệm trong 1 giờ trong các đĩa 96 giếng. Các phản ứng được dừng lại bằng cách dùng đệm glyxin-carbonat ở pH= 10,7. Tín hiệu huỳnh quang được đọc trên máy đọc đĩa ở bước sóng kích thích là 360nm và bước sóng phát xạ là 450nm. Nồng độ protein trong dịch ly giải được đánh giá bằng cách sử dụng kit thử nghiệm axit bicinchoninic. 4-metylumbelliferon được dùng làm chất chuẩn. Hoạt tính GAA được báo cáo ở dạng số nmol 4-metylumbelliferon được giải phóng trên một giờ trên một mg protein tinh sạch. Xem Fuller và cộng sự, "Isolation and characterisation of a recombinant, precursor form of lysosomal acid alpha-glucosidase", 234(3) European Journal of Biochemistry 903-909 (1995).

Nội hóa hoạt tính GAA được đánh giá khi có mặt hoặc vắng mặt mannoza 6-phosphat (M6P) (Fig. 4A), và khi có mặt hoặc vắng mặt CD63. Một số enzym lysosom được gắn thẻ vào lysosom qua gốc M6P gắn kèm mà gắn với thụ thể mannoza 6-phosphat (MPR). Do đó, sự liên quan của CI-MPR đến việc nội hóa kháng thể kháng CD63-GAA được đánh giá bởi bao gồm M6P 5 mM, mà cạnh tranh để gắn kết MPR, trong môi trường nuôi cấy HEK trong khi hấp thu kháng thể kháng CD63-GAA. Sự bao gồm M6P không có tác động trong việc hấp thu kháng thể kháng CD63-GAA khi được xác định bằng việc phát hiện 4-metylumbelliferon trong dịch ly giải tế bào (Fig. 4A). Tuy nhiên, việc hấp thu kháng thể kháng CD63-GAA phụ thuộc vào sự có mặt của CD63 (Fig. 4B). Kháng thể kháng CD63 • GAA được hấp thu bởi- các tế bào HEK mà biểu hiện CD63, nhưng không được hấp thu bởi các tế bào HEK mang bản sao bất hoạt của gen CD63 (Fig. 4B).

Bảng 3

Cấu trúc	Biểu hiện trong CHO	Hoạt tính GAA (<i>in vitro</i>)	Nhắm đích			
			Hoạt tính GAA	Phụ thuộc MPR	Phụ thuộc CD63	Đồng định vị trong lysosom
IgG4 kháng CD63	++	NA	Không	Không	Có	Có
Dung hợp Fc-GAA (xem Fig. 1B(i))	+	+	NA	NA	NA	NA
GAA-Fc•kháng CD63 (xem Fig. 1B)	NA	+	Có	Không	Có	NT
Kháng thể kháng CD63-GAA (xem Fig. 1C)	++	+	Có	Không	Có	Có
GAA-kháng CD63 (xem Fig. 1D)	+	+	Có	Không	Có	NT
GAA	NT	+	Có	Có	Không	NT
GLA	NA	-	NA	Có	Không	NT
•GLA• kháng CD63	NA	-	NA	Không	Có	NT

NA = Không áp dụng được; NT = Không được thử nghiệm

Ví dụ 3: Hấp thu cấu trúc GAA nguyên bào cơ

Khả năng của nguyên bào cơ xương, mà là một loại mô được quan tâm ở bệnh Pompe, trong việc hấp thu các cấu trúc GAA khác nhau được kiểm tra. Nguyên bào cơ xương của người được nuôi cấy khi có mặt các nồng độ khác nhau (*tức là*, 25 nM, 50 nM, và 200 nM) của (1) kháng thể kháng CD63- GAA, (2) kháng thể kháng CD63-

GAA cộng M6P 5 mM, (3) myc-GAA, và (4) myc-GAA cộng M6P 5 mM. Nội hóa các cấu trúc GAA được suy đoán từ mức độ hoạt tính GAA được phát hiện trong dịch ly giải tế bào, như được chỉ ra bởi sự tích tụ 4-methylumbelliferon, được đánh giá. Việc hấp thu 200 nM kháng thể kháng CD63-GAA, mà độc lập với MPR, lớn hơn gấp năm lần so với việc hấp thu myc-GAA, mà phụ thuộc vào MPR (Fig. 5A).

Để xác định sự định vị dưới tế bào của cấu trúc kháng thể kháng CD63-GAA, nguyên bào cơ xương của người được nhuộm bằng kháng thể kháng IgG của người (để phát hiện gốc kháng CD63 của cấu trúc kháng thể kháng CD63-GAA) và các kháng thể kháng LAMP (để đánh dấu các lysosom). LAMP, hay là glycoprotein màng liên kết với lysosom, bao gồm các protein màng không tách rời mà đặc hiệu với các lysosom. Thí nghiệm đồng đánh dấu được chứng minh là kháng thể kháng CD63-GAA được đồng định vị với kháng thể kháng LAMP, biểu thị rằng kháng thể kháng CD63-GAA định vị đến các lysosom.

Tương tự là, các nguyên bào cơ C2C12 của chuột được tiếp xúc với các nồng độ khác nhau, *tức là*, 25 nM, 50 nM, và 200 nM, của (1) kháng thể kháng CD63-GAA, (2) kháng thể kháng CD63-GAA cộng M6P 5 mM, (3) myc-GAA, và (4) myc-GAA cộng M6P 5 mM. Nội hóa các cấu trúc GAA được suy đoán từ mức độ hoạt tính GAA được phát hiện trong dịch ly giải tế bào, như được chỉ ra bởi sự tích tụ 4-methylumbelliferon, được đánh giá. Việc hấp thu kháng thể kháng CD63-GAA 200 nM, mà không bị ảnh hưởng bất lợi bởi M6P, mà nhiều hơn gấp khoảng sáu lần đến khoảng chín lần so với việc hấp thu myc-GAA (Fig. 5B).

Ví dụ 4: Tác động của kháng thể kháng CD63-GAA đến việc tích trữ Glycogen

Tác động của kháng thể kháng CD63-GAA đến việc tích trữ glycogen trong lysosom của ba dòng tế bào Pompe khác nhau được đánh giá. Các dòng tế bào Pompe được bắt nguồn từ các nguyên bào sợi thu được từ các bệnh nhân mắc bệnh Pompe khởi phát tuổi ấu niên và bao gồm các đột biến bất hoạt (knock-out) hoặc giảm biểu hiện (knock-down) trong gen GAA. Các dòng tế bào được sử dụng là GM20089 (đột biến xóa exon 18), GM20090 (phức dị hợp tử trong exon 14 và 16), và GM20090 (phức dị hợp tử trong exon 2). Các dòng này được lấy từ Coriell Institute, Camden, NJ. Xem Huie và cộng sự, "Increased occurrence of cleft lip in glycogen storage disease type II (GSDII): exclusion of a contiguous gene syndrome in two patients by presence

of intragenic mutations including a novel nonsense mutation Gln58Stop”, 85(1) Am. J. Med. Genet. 5-8 (1999); Huie và cộng sự, “Glycogen storage disease type II: identification of four novel missense mutations (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid alpha-glucosidase locus of patients of differing phenotype”, 244(3) Biochem. Biophys. Res. Commun. 921-7 (1998) và; Nishiyama và cộng sự, “Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease”, 107 Molecular genetics và metabolism 490-5 (2012). Nguyên bào sợi da của người mới được hình thành (NHDF, Lonza) được sử dụng làm đối chứng. Tất cả các dòng tế bào Pompe đều cho thấy sự tích trữ glycogen trong lysosom (sau 72 giờ cắt giảm glucoza để giảm glycogen trong bào tương) mặc dù hoạt tính GAA còn lại ($< 0,1\%$) có mặt (Fig. 6, các hình A và B, tương ứng). Glycogen được đo mà sử dụng kit thử đánh giá glycogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Các tế bào được cắt giảm glucoza trong khoảng 96 giờ trước khi ly giải để loại bỏ glycogen trong bào tương (xem Umapathysivam và cộng sự, “Correlation of acid alpha-glucosidase and glycogen content in skin fibroblasts with age of onset in Pompe disease”, 361(1-2) Clin Chim Acta. 191-8 (2005)). Các tế bào được xử lý bằng kháng thể kháng CD63-GAA (200 nM) hoặc myc-GAA (200 nM) trong 72 giờ trước khi ly giải. Với tất cả ba dòng tế bào Pompe, việc xử lý bằng kháng thể kháng CD63-GAA dẫn đến sự giảm đáng kể về tích trữ glycogen trong lysosom (Fig. 7), chỉ ra rằng kháng thể kháng CD63-GAA được sử dụng bên ngoài đã đến được lysosom và được hoạt hóa bằng enzym.

Ví dụ 5: Các isozym với GAA

Để tránh các đáp ứng miễn dịch có thể xảy ra ở các bệnh nhân Pompe với GAA (tức là, vật liệu miễn dịch phản ứng chéo hay là CRIM), việc vận chuyển các glucosidaza của người khác để cứu hoạt tính GAA được đánh giá. Các enzym không thuộc lysosom có hoạt tính thủy phân glycogen giống với GAA (a.k.a. axit α -glucosidaza) được đánh giá. Các enzym này bao gồm sucraza-isomaltaza (SI), maltaza-glucoamylaza (MGAM), glucosidaza II (GANAB), và α -glucosidaza trung hòa (C GNAC). Các enzym này và các phương án tái tổ hợp khác được mô tả trong Dhital và cộng sự, “Mammalian mucosal α -glucosidases coordinate with α -amylase in

the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis”, 8(4) PLoS One e62546 2013 Apr 25 (2013); Sim và cộng sự, “Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity”, 375(3) J. Mol. Biol. 782-92 (2008); và Quezada-Calvillo và cộng sự, “Luminal starch substrate “brake” on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit”, 138(4) J. Nutr. 685-92 (2008).

Các cấu trúc isozym sau được tạo ra và được biểu hiện trong các tế bào CHO: (1) kháng thể kháng CD63, (2) kháng thể kháng CD63-NtMGAM (*tức là*, tiểu phần đầu N của maltaza-glucoamylaza nối với đầu C của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD63), và (3) kháng thể kháng CD63-CtMGAM. Xem Dhital, 2013. Cấu trúc khác mà biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể kháng CD63 của chuột được dung hợp với tiểu phần đầu C của maltaza-glucoamylaza của chuột (kháng thể kháng mCD63-mctMGAM) cũng được thiết kế để sử dụng trong các mô hình chuột (xem Ví dụ 11).

Ví dụ 6: Protein dung hợp α -Galactosidaza A (GLA) Lyzosom

Các protein dung hợp khác nhau mà chứa GLA của người (SEQ ID NO:2) được xây dựng và được biểu hiện trong các tế bào CHO. Các cấu trúc này bao gồm (i) GLA được dung hợp với đầu C của các chuỗi nặng của kháng thể kháng CD63 (kháng CD63-GLA), (ii) GLA được dung hợp với globulin miễn dịch Fc (*ví dụ*, Fc “bấm”), (iii) GLA-kháng CD63 (*tức là*, GLA được dung hợp với đầu N của các chuỗi nặng của kháng thể kháng CD63), và (iv) thể dung hợp GLA-myc (Fig. 8). Các protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa (IEBP) không chứa gốc GLA cũng được thiết kế và biểu hiện. Trong một trường hợp, IEBP là kháng thể đặc hiệu kép với một nửa mà có tính đặc hiệu gắn kết với CD63 và nửa còn lại mà có tính đặc hiệu gắn kết với myc. GLA hoạt tính enzyme (*tức là*, sự thủy phân 4-methylumbelliferyl- β -galactopyranosit) được đánh giá đối với mỗi protein dung hợp GLA, các kết quả của chúng được biểu diễn trong Fig. 9. Với sự ngoại trừ thể dung hợp kháng CD63-GLA đầu C, tất cả các cấu trúc đã cho thấy hoạt tính của α -galactosidaza (Fig. 9). Các Fc bấm được mô tả trong Ridgway và cộng sự, “‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization”, 9(7) Protein Eng. 617-621 (1996).

Sự nội hóa mỗi cấu trúc (hoặc tổ hợp của IEBP và GLA-myc) vào trong các tế bào HEK được xác định bằng cách đo sự tạo thành metylumbelliferon từ sự thủy phân 4-methylumbelliferyl- β -galactopyranosit được xúc tác bởi enzym. Các cấu trúc khác nhau được thêm vào các tế bào HEK293, mà sau đó, được ủ để diễn ra quá trình nhập bào, sau đó, được rửa và ly giải ở độ pH=4. Cơ chất GLA được thêm vào mỗi dịch ly giải tế bào và phản ứng α -galactosidaza được diễn ra. Các kết quả được biểu thị trong Fig. 9, mà biểu thị rằng protein dung hợp GLA-kháng CD63 được nội hóa vào trong các tế bào HEK. Chỉ một mình GLA-myc, *tức là*, khi vắng mặt thành phần IEBP, đã không được hấp thu bởi các tế bào HEK. Tuy nhiên, nó được hấp thu khi có mặt kháng thể đặc hiệu kép mà gắn với CD63 và gắn với quyết định kháng nguyên myc (Fig. 10).

Ví dụ 7: Hấp thu các protein gắn kết yếu tố tác động nội bào hóa

Việc nội hóa kháng thể kháng CD63 hoặc kháng thể kháng APLP2 vào trong các phân đoạn tế bào có pH thấp được so sánh với việc nội hóa GLA của người tái tổ hợp (rhGLA), mà có hàm lượng M6P cao, vào trong các phân đoạn tế bào có pH thấp. Mỗi kháng thể GLA, kháng CD63, và kháng APLP2 được đánh dấu bằng chất nhuộm nhạy cảm với pH thấp pHrodo® (Invitrogen, Calsbad, CA). Các tế bào HEK, các tế bào HepG2 (ung thư biểu mô gan), và các tế bào PC-3 (ung thư tuyến tiền liệt) được tiếp xúc với các protein được đánh dấu pHrodo® và được ủ qua đêm hoặc trong khoảng 16 giờ. Sau đó, các tế bào này được hình ảnh hóa và các bóng nhỏ huỳnh quang được đếm. Đầu ra huỳnh quang được chuẩn hóa theo mức độ đánh dấu cho mỗi protein. Các tế bào HEK, PC-3 và HepG2 đã chứng minh sự hấp thu kháng thể kháng CD63 và kháng APLP2 cao hơn so với rhGLA (Fig. 11).

Ví dụ 8: Xử lý protein dung hợp trong lyzozom

Kiểm tra việc cấu trúc kháng thể kháng CD63-GAA có được xử lý bằng cách ly giải bằng protein trong lyzozom không bằng cách sử dụng phân tích western blot của dịch ly giải tế bào Pompe. Các tế bào Pompe GM20089 được nuôi cấy khi có mặt kháng thể kháng CD63-GAA và tiếp sau đó, dịch ly giải tế bào được thực hiện phân tích western blot khử sử dụng kháng thể kháng GAA (Fig. 12, hình A) hoặc kháng thể kháng kháng hIgG (Fig. 12, hình B).

Dòng tế bào nguyên bào sợi bệnh Pompe GM20089 từ Coriell được trải ở trên các đĩa 6 giếng và được ủ với kháng thể kháng CD63-GAA trong 18 giờ và sau đó được rửa sạch bằng môi trường. Các giếng được ly giải trong đệm RIPA ở các thời điểm khác nhau, *tức là*, 0, 24, 48, 72 giờ sau khi loại bỏ kháng thể kháng CD63-GAA. Dịch ly giải được đánh giá về GAA bằng western blot mà sử dụng kháng thể kháng GAA của người (ab113021, Abcam LTD, Cambridge, UK; Fig. 12). Kháng thể kháng CD63-GAA dạng đầy đủ và các phần tử trung gian nhỏ hơn được phát hiện ở các thời điểm sớm hơn, và dạng 76kDa trưởng thành trong lysosom của GAA được phát hiện ở tất cả các thời điểm sau khi dùng kháng thể kháng CD63-GAA. Điều này chứng minh rằng các kháng thể kháng CD63-GAA nội hóa đi vào trong các tế bào bệnh nhân và được xử lý chính xác với dạng trong lysosom trưởng thành của GAA. Hơn nữa, chu kỳ bán rã của dạng 76kDa trong các tế bào khớp với các nghiên cứu khác về sự nội hóa GAA (Maga, J. A. và cộng sự Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid α -glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice. Journal of Biological Chemistry 288, 1428-1438 (2013).)

Ví dụ 9: Sự phân bố và xử lý trong mô của kháng thể kháng CD63-GAA

Chuột được xử lý mang gen giống của người ở locut CD63 (xem Valenzuela và cộng sự, “High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis”, 21 Nature Biotechnology 652 - 659 (2003)) được sử dụng kháng thể kháng CD63-GAA. Các mẫu mô được lấy và GAA được đánh giá qua phân tích western blot. GAA được phát hiện trong gan, cơ hoành, thận, tim, và cơ tứ đầu và cơ hai đầu (Fig. 13).

Ngắn gọn là, chuột có CD63 giống của người được tạo ra bằng cách chuyển locut CD63 của người vào trong locut CD63 của chuột. Kháng thể kháng CD63-GAA hoặc kháng CD63 được sử dụng bằng cách tiêm ven đuôi ở lượng 50mg/kg vào chuột có CD63 giống của người 2 tháng tuổi hoặc chuột kiểu đại thiếu CD63 của người. Lấy máu đuôi được thực hiện ở các thời điểm khác nhau, *ví dụ*, 0, 6, 24 giờ sau khi tiêm. ELISA với kháng thể kháng Fc của người được thực hiện để xác định nồng độ kháng thể kháng CD63-GAA trong huyết thanh. Kháng thể kháng CD63-GAA được dọn sạch nhanh chóng khỏi huyết thanh và nhanh hơn kháng thể kháng CD63 gốc. Chuột được tiêm cũng được làm chết ở các thời điểm khác nhau và các mô được mổ lấy ra và được

đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Các mô được ly giải trong đệm RIPA và được đánh giá về GAA bằng western blot. Dạng lyzom trưởng thành 76kDa có trong hầu hết các mô được đánh giá, chứng minh sự nội hóa của kháng thể kháng CD63-GAA đi vào trong các tế bào bên trong mô (Fig. 13). Chuột mang CD63 được làm giống với của người đã nội hóa kháng thể kháng CD63-GAA trong cơ xương (tim, cơ nhị đầu, cơ tứ đầu), nhưng chuột kiểu đại không biểu thị bất kỳ sự hấp thu nào. Điều này chứng minh rằng kháng thể kháng CD63-GAA đã nội hóa đi vào trong các tế bào cơ xương nhờ trung gian CD63.

Chuột có CD63 được làm giống của người (CD63^{hu/hu}) và chuột đối chứng (CD63^{+/+}) được sử dụng kháng thể kháng CD63-GAA ở liều lượng 50 mg/kg qua tiêm ven đuôi. Ở thời điểm 24 giờ, các mô được chiết và 200 µg dịch ly giải tế bào được nạp trên mỗi lần. Lai western blot được dùng mẫu dò bằng kháng thể kháng hGAA và kháng thể kháng GAPDH là đối chứng nạp. Fig. 14 mô tả ảnh lai western blot và chứng minh rằng CD63 đã trung gian cho việc hấp thu kháng thể kháng hCD63-GAA vào trong mô cơ ở chuột CD63^{hu/hu} nhưng không ở chuột WT CD63^{+/+}. Kháng thể kháng hCD63-GAA được xử lý thành hGAA 76 kDa trưởng thành.

Ví dụ 10: Các yếu tố tác động nội bào hóa đặc hiệu cơ

Các kháng thể được biotin hóa nhận biết các kháng nguyên đặc hiệu cơ, mà bao gồm kháng thể kháng integrin alpha 7, kháng thể kháng CD9, và kháng thể kháng dystroglycan, được sử dụng với chuột bất hoạt GAA. Sự phân bố trong mô của các kháng thể này được xác định bằng phân tích western blot. Fig. 15 mô tả biểu đồ histogram về mức độ kháng thể được tìm thấy bên trong cơ xương (cơ song đầu, cơ tứ đầu, và cơ hoành), cơ tim, gan (có vào trò như là đường chuẩn cho quá trình chuẩn hóa), thận và lá lách. Các kháng thể kháng integrin alpha 7 được tìm thấy (ở mức độ vượt quá mức độ được tìm thấy trong gan) ở cơ xương và tim. Các kháng thể kháng CD9 được tìm thấy (ở mức độ vượt quá mức độ được tìm thấy trong gan) ở cơ xương và tim, và cũng như ở thận và lá lách (Fig. 15).

Để xác định liệu các kháng thể đặc hiệu cơ chọn lọc này có thể nhắm đích lyzom hay không, các kháng thể này được đánh dấu bằng pHrodo-màu đỏ và sau đó được ủ qua điểm ở nồng độ 10 µg/mL với nguyên bào cơ C2C12 của chuột. Tín hiệu huỳnh quang thuộc tiểu bào được định lượng và chuẩn hóa đến mức độ của việc đánh

dầu bằng chất phát quang trên kháng thể Các kết quả được mô tả trên Fig. 16, mà biểu thị kháng thể kháng CD63, kháng thể kháng dystroglycan, kháng thể kháng M-cadherin, kháng thể kháng CD9, và kháng thể kháng integrin alpha 7 được nhắm đích đến phân đoạn lysosom có độ pH thấp của các nguyên bào cơ C2C12.

Ví dụ 11: Sự phục hồi của mức độ glycogen trong cơ

Chuột bất hoạt (KO) GAA 2-3 tháng tuổi với sự biểu hiện CD63 của chuột nguyên bản được trở thành đối tượng để vận chuyển thủy động lực học (HDD) các cấu trúc plasmid mã hóa α -glucosidaza của người có đủ chiều dài (hGAA), kháng thể kháng mCD63-GAA (kháng thể kháng CD63 của chuột) và chuỗi nhẹ kết hợp của nó, hoặc kháng thể kháng hCD63-GAA (kháng thể kháng CD63 của người) và chuỗi nhẹ kết hợp của nó. Tất cả các cấu trúc đã sử dụng các mạch chính plasmid giống hệt nhau bao gồm promotor ubiquitin và đuôi polyA SV40. Ngắn gọn là, 40 μ g của mỗi plasmid (tức là 40 μ g chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, hoặc chỉ hGAA) được pha loãng trong 2-3mL nước muối khử trùng và được tiêm nhanh vào trong ven đuôi của chuột KO GAA. Lấy máu đuôi được thực hiện 3 ngày một lần đã chứng minh nồng độ hGAA hoặc các cấu trúc kháng thể-GAA trong huyết thanh trong ~10 ngày. Chuột được làm chết sau HDD 3 tuần, và các mô được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Các mô được đồng nhất hóa trong nước cất, được đun sôi, và quay ly tâm để lắng xuống. Các dịch nổi được đánh giá về glycogen mà sử dụng kit đánh giá glycogen huỳnh quang (MAK016, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)

Nồng độ glycogen trong tim, cơ hoành, và cơ xương bao gồm cơ tam đầu, cơ song đầu, và cơ tứ đầu được xác định trong chuột kiểu dại, chuột KO GAA, và chuột KO GAA được xử lý bằng hGAA hoặc kháng thể kháng mCD63-GAA được vận chuyển thủy động lực học và được biểu hiện. Các kết quả được mô tả trong Fig. 17, mà biểu thị sự phục hồi glycogen đến gần nồng độ kiểu dại ở chuột được xử lý kháng thể kháng mCD63-GAA. Hiệu quả hồi phục glycogen rõ ràng hơn với kháng thể kháng mCD63-GAA, mà biểu thị gần đến 100% sự hồi phục nồng độ glycogen trong cơ kiểu dại, hơn so với chỉ một mình hGAA, mà biểu thị chỉ khoảng 10% đến 35% sự giảm nồng độ glycogen trong cơ xương hoặc cơ hoành ở chuột KO GAA (xem Fig. 17).

Nồng độ glycogen trong tim, cơ hoành, và cơ xương bao gồm cơ tam đầu, cơ song đầu, và cơ tứ đầu được xác định trong chuột kiểu dại, chuột KO GAA, và chuột KO GAA được xử lý bằng kháng thể kháng hCD63-GAA, kháng thể kháng mCD63-GAA, hoặc kháng thể kháng mCD63-mctMGAM được vận chuyển thủy động lực học (HDD) và được biểu hiện. Các kết quả được mô tả trong Fig. 18 biểu thị sự phục hồi glycogen đến gần nồng độ kiểu dại ở chuột được xử lý bằng kháng thể kháng mCD63-GAA. Hiệu quả hồi phục glycogen rõ ràng hơn với kháng thể kháng mCD63-GAA, mà biểu thị sự hồi phục nồng độ glycogen trong cơ đến khoảng trong vòng 20% nồng độ kiểu dại, hơn so với chỉ một mình kháng thể kháng hCD63-GAA, mà biểu thị chỉ khoảng 20% sự giảm nồng độ glycogen trong cơ xương hoặc cơ hoành ở chuột KO GAA (xem Fig. 18). Ngoài ra, kết quả này còn xác nhận hiệu quả được tăng cường của việc vận chuyển GAA đến lysosom qua sự nội hóa CD63 đặc hiệu loài. Việc điều trị bằng kháng thể kháng mCD63-mctMGAM qua HDD ở chuột KO GAA so với chuột KO GAA đối chứng (không được điều trị) được thẩm định trong 7 hoặc 12 ngày sau HDD (xem Fig. 20). Glycogen giảm được quan sát thấy *in vivo* ở chuột KO GAA được điều trị bằng cấu trúc HDD kháng mCD63-mctMGAM đặc hiệu chuột ở hai thời điểm, trong khi, ngược lại, chuột không được điều trị kiểu dại ở cùng một điều kiện không biểu thị sự thay đổi về tích trữ glycogen (Fig. 20).

Ví dụ 12: Lipaza axit lysosomal

Lipaza axit lysosomal (LAL hoặc LIPA) là enzym mà bề gãy các cholesteryl este và các triglycerit trong lysosom. Sự sai hỏng trong LIPA (*ví dụ*, LAL-D hoặc bệnh Wolman) dẫn đến sự tăng dần nguyên liệu chất béo trong gan, lá lách và các cơ quan khác. Tỷ lệ mắc bệnh đối với LAL-D nằm trong khoảng từ 1 trên 40.000 người đến 1 trên 300.000 trên toàn thế giới. Trẻ sơ sinh có sự thiết hụt LIPA nếu không được điều trị sẽ tử vong trong vòng từ 6-12 tháng do suy đa cơ quan. Các trẻ lớn hơn có thể vẫn không chẩn đoán được bệnh cho đến khi chúng tử vong vì đau tim, đột quỵ hoặc suy gan.

Để kiểm tra tác động của kháng thể mà nối với LIPA đến hoạt tính lipaza nội sinh, hai cấu trúc kháng thể LIPA được tạo ra: thể dung hợp đầu C chuỗi nặng (kháng myc-LIPA); và thể dung hợp đầu N chuỗi nặng (LIPA-kháng myc). cADN của các axit amin từ 24-399 của enzym axit lipaza trong lysosom của người (SEQ ID NO:3) được

tách dòng vào trong đầu N hoặc đầu C của plasmit chứa chuỗi nặng của kháng thể. Trình tự phân cắt được cathepsin được sử dụng như một phần tử nối giữa chuỗi nặng và enzym. Các cấu trúc cùng với chuỗi nhẹ tương ứng được tải biến nạp vào trong các tế bào CHO-K1. Các thể nổi của tế bào CHO được thu sau biến nạp 5 ngày và được lọc vô trùng. Các thể nổi này trở thành đối tượng của phân tích western blot và được dò bởi kháng thể kháng LIPA và kháng thể kháng hIgG. Sự biểu hiện của LIPA, kháng thể kháng myc-LIPA, và LIPA-kháng myc trong các tế bào CHO được xác nhận.

Các sản phẩm pha loãng của dịch nổi trong đệm thử nghiệm (natri axetat 0,2 M, kali clorua 0,4 M, pH= 4,3) được ủ bằng 4-methylumbelliferyl oleat, cơ chất của enzym LIPA, trong 1 giờ. Các phản ứng được dừng lại bằng cách dùng đệm glyxin-carbonat ở pH= 10,7. Tín hiệu huỳnh quang được đọc trên máy đọc đĩa ở bước sóng kích thích là 360nm và bước sóng phát xạ là 450nm. Cả hai cấu trúc kháng myc-LIPA và LIPA-kháng myc đều thể hiện hoạt tính lipaza đáng kể so với đối chứng LIPA nguyên bản (Fig. 19).

Sáng chế không bị giới hạn về phạm vi bảo hộ bởi các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Thực chất, các phương án biến đổi khác nhau của sáng chế ngoài các phương án được mô tả ở đây là dễ dàng suy luận được với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ phần mô tả nêu trên. Các phương án biến đổi như vậy được chủ định nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa enzym liên quan đến bệnh tích trữ trong lyzosom (lyzosomal storage disease – LSD) và protein liên kết kháng nguyên,

trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm α -galactosidaza, β -galactosidaza, α -glucosidaza (GAA), β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, ceramidaza, sphingomyelinaza, β -hexosaminidaza, chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arysulfataza, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparin N-sulfataza, N-acetyl- α -glucosaminidaza, α -glucosamit N-acetyltransferaza, N-acetylglucosamin-6-sulfataza, N-acetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, N-acetylgalactosamin-4-sulfataza, β -glucuronidaza, hyaluronidaza, và lipaza axit lyzosomal (lyzosomal acid lipase – LAL),

trong đó protein liên kết kháng nguyên liên kết yếu tố tác động nội bào hóa, và

trong đó yếu tố tác động nội bào hóa là CD63.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm α -galactosidaza (GLA), β -galactosidaza (GLB), và α -glucosidaza (GAA).

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó protein liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm phân tử dung hợp-thụ thể, phân tử bắt giữ, phân tử dung hợp Fc-thụ thể, kháng thể, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fd, mảnh Fv, phân tử Fv đơn chuỗi (scFv), mảnh dAb, vùng xác định bổ sung (CDR) được phân lập, peptit CDR3, peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc, kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể đơn miễn, kháng thể xóa miễn, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể nhỏ, thể nano, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, được phẩm miễn dịch chất điều biến nhỏ (SMIP), kháng thể lạc đà (kháng thể đồng dime của chuỗi nặng VHH), và miễn IgNAR biến đổi của cá mập.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó enzym được liên kết cộng hóa trị với protein liên kết kháng nguyên, và tùy ý trong đó:

(i) protein liên kết kháng nguyên bao gồm nửa kháng thể, enzym lyzosom được liên kết cộng hóa trị với miền Fc của globulin miễn dịch, và miền Fc được liên kết cộng hóa trị với enzym liên kết với miền Fc của protein liên kết kháng nguyên; hoặc

(ii) protein liên kết kháng nguyên bao gồm kháng thể, và enzym được liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nặng của kháng thể.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó enzym được liên kết cộng hóa trị với protein liên kết kháng nguyên, và tùy ý trong đó:

(i) protein liên kết kháng nguyên liên kết với cả yếu tố tác động nội bào hóa và enzym, và/hoặc

(ii) protein liên kết kháng nguyên là kháng thể đặc hiệu kép liên kết yếu tố tác động nội bào hóa và enzym.

6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó enzym là GAA hoặc GLA hoặc có hoạt tính GAA hoặc GLA.

7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó:

(i) enzym là GAA hoặc có hoạt tính GAA, và enzym bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1; hoặc

(ii) enzym là GLA hoặc có hoạt tính GLA, và enzym bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2.

8. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng trong phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh tích trữ trong lysosom (LSD), phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng phức hợp trị liệu sinh học và trong đó phức hợp trị liệu sinh học đi vào trong lysosom của tế bào của đối tượng và tạo ra hoạt tính enzym (“enzym thay thế”) mà thay thế hoạt tính enzym liên quan đến LSD (“enzym nội sinh”), trong đó phức hợp trị liệu sinh học chứa:

(a) enzym thay thế được chọn từ nhóm bao gồm α -galactosidaza, β -galactosidaza, α -glucosidaza (GAA), β -glucosidaza, chất hoạt hóa saposin-C, ceramidaza, sphingomyelinaza, β -hexosaminidaza, chất hoạt hóa GM2, GM3 synthaza, arylsulfataza, chất hoạt hóa sphingolipit, α -iduronidaza, iduronidaza-2-sulfataza, heparin *N*-sulfataza, *N*-axetyl- α -glucosaminidaza, α -glucosamit *N*-axetyltransferaza, *N*-axetylglucosamin-6-sulfataza, *N*-axetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza, *N*-axetylgalactosamin-4-sulfataza, β -glucuronidaza, hyaluronidaza, và lipaza axit lysosomal (lysosomal acid lipase - LAL), và

(b) protein liên kết kháng nguyên liên kết yếu tố tác động nội bào hóa, trong đó yếu tố tác động nội bào hóa là CD63.

9. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng theo điểm 8, trong đó LSD:

(i) được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn chuyển hóa sphingolipit, rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharit, và bệnh tích trữ glycogen;

(ii) được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Fabry, bệnh Gaucher typ I, bệnh Gaucher typ II, bệnh Gaucher typ III, bệnh Niemann-Pick typ A, bệnh Niemann-Pick typ B, rối loạn chuyển hóa GM1-gangliosit, bệnh Sandhoff, bệnh Tay-Sachs, chứng thiếu hụt chất hoạt hóa GM2, chứng rối loạn do tích tụ gangliosit-GM3, loạn dưỡng bạch cầu biến sắc, chứng thiếu hụt chất hoạt hóa sphingolipit, bệnh Scheie, bệnh Hurler-Scheie, bệnh Hurler, bệnh Hunter, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, hội chứng Morquio A, hội chứng Morquio B, bệnh Maroteaux-Lamy, bệnh Sly, MPS IX, và bệnh Pompe; hoặc

(iii) bệnh Fabry hoặc bệnh Pompe.

10. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng theo điểm 8 hoặc 9, trong đó:

(i) enzym thay thế không gây ra phản ứng miễn dịch ở đối tượng; và/hoặc

(ii) enzym thay thế là isozym.

11. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng theo điểm 10, trong đó enzym thay thế là isozym và trong đó:

(i) LSD là bệnh Pompe, enzym nội sinh là α -glucosidaza (GAA), và isozym được chọn từ nhóm bao gồm axit α -glucosidaza, sucraza-isomaltaza (SI), maltaza-glucoamylaza (MGAM), glucosidaza II (GANAB), và α -glucosidaza trung hòa (C GNAC); hoặc

(ii) LSD là bệnh Fabry, enzym nội sinh là α -galactosidaza A (GLA), và isozym là α -N-axetyl-galactosaminidaza được thiết kế để có hoạt tính GLA.

12. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng theo điểm 10 hoặc 11, trong đó protein liên kết kháng nguyên liên kết yếu tố tác động nội bào hóa là kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

13. Phức hợp trị liệu sinh học để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, trong đó:

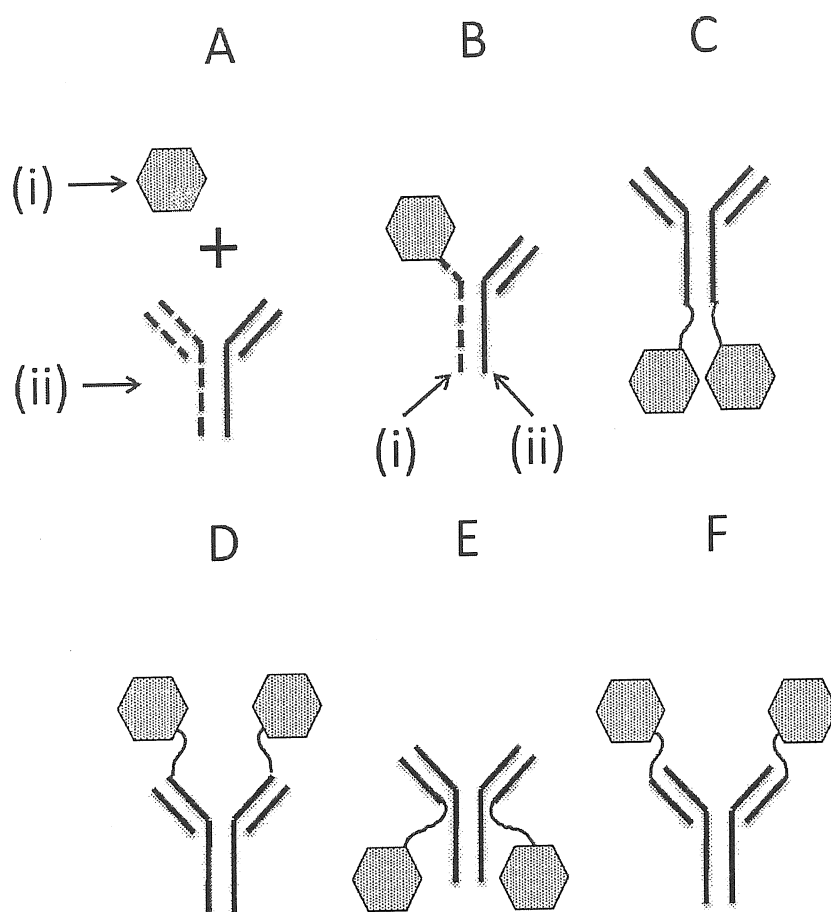
(i) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm enzym thay thế và kháng thể đặc hiệu kép liên kết enzym thay thế và yếu tố tác động nội bào hóa, và tùy ý trong đó (a) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm GLA và kháng thể đặc hiệu kép liên kết GLA và CD63, và LSD là bệnh Fabry, hoặc (b) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm GAA và kháng thể đặc hiệu kép liên kết GAA và CD63, và LSD là bệnh Pompe;

(ii) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm protein dung hợp Fc-enzym và nửa kháng thể yếu tố tác động kháng nội bào hóa;

(iii) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm enzym thay thế được liên kết cộng hóa trị với đầu C của chuỗi nặng của kháng thể yếu tố tác động kháng nội bào hóa; hoặc

(iv) phức hợp trị liệu sinh học bao gồm enzym được liên kết cộng hóa trị với đầu N của chuỗi nặng của kháng thể yếu tố tác động kháng nội bào hóa.

FIG. 1



2/20

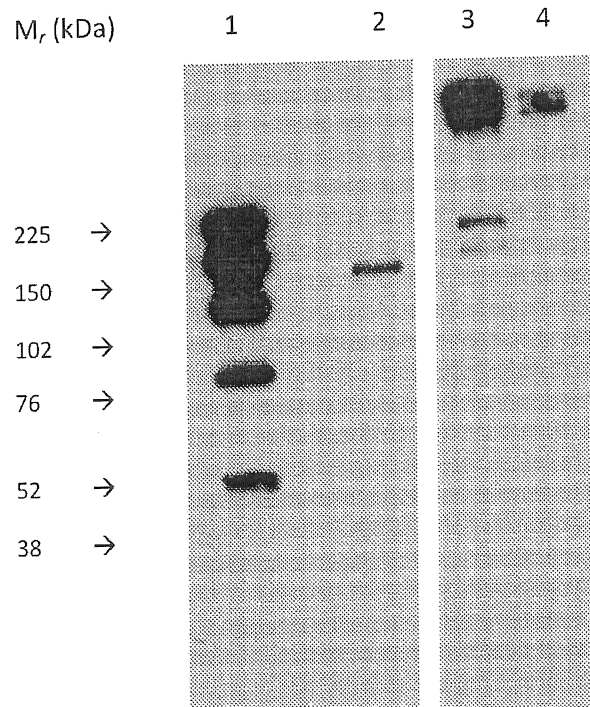
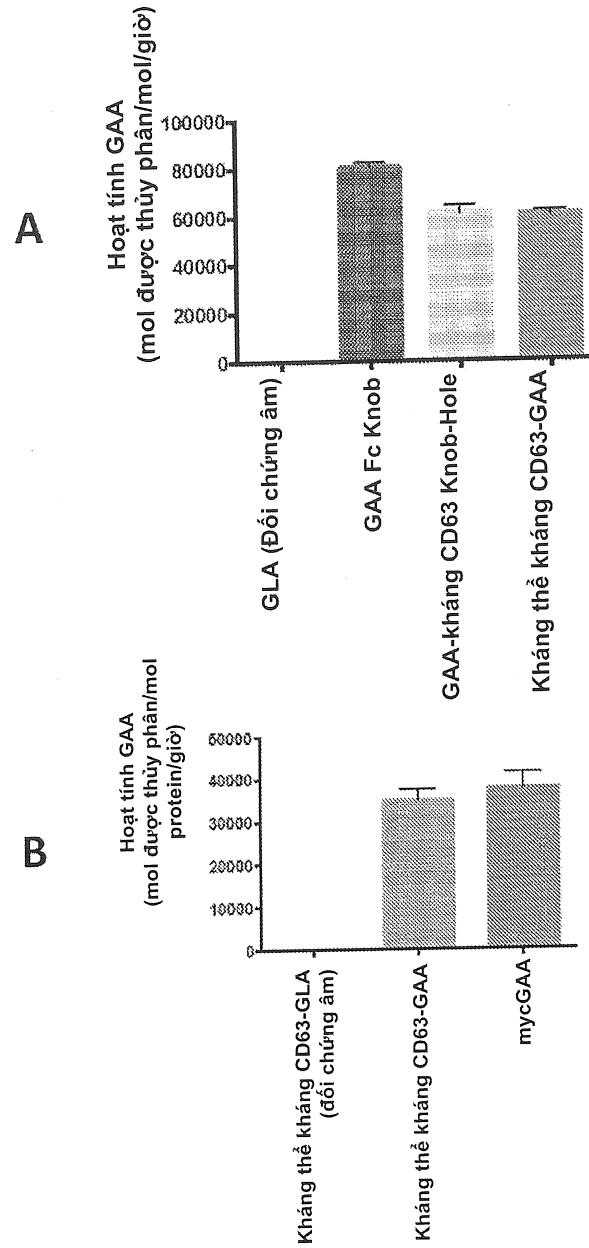


FIG. 2

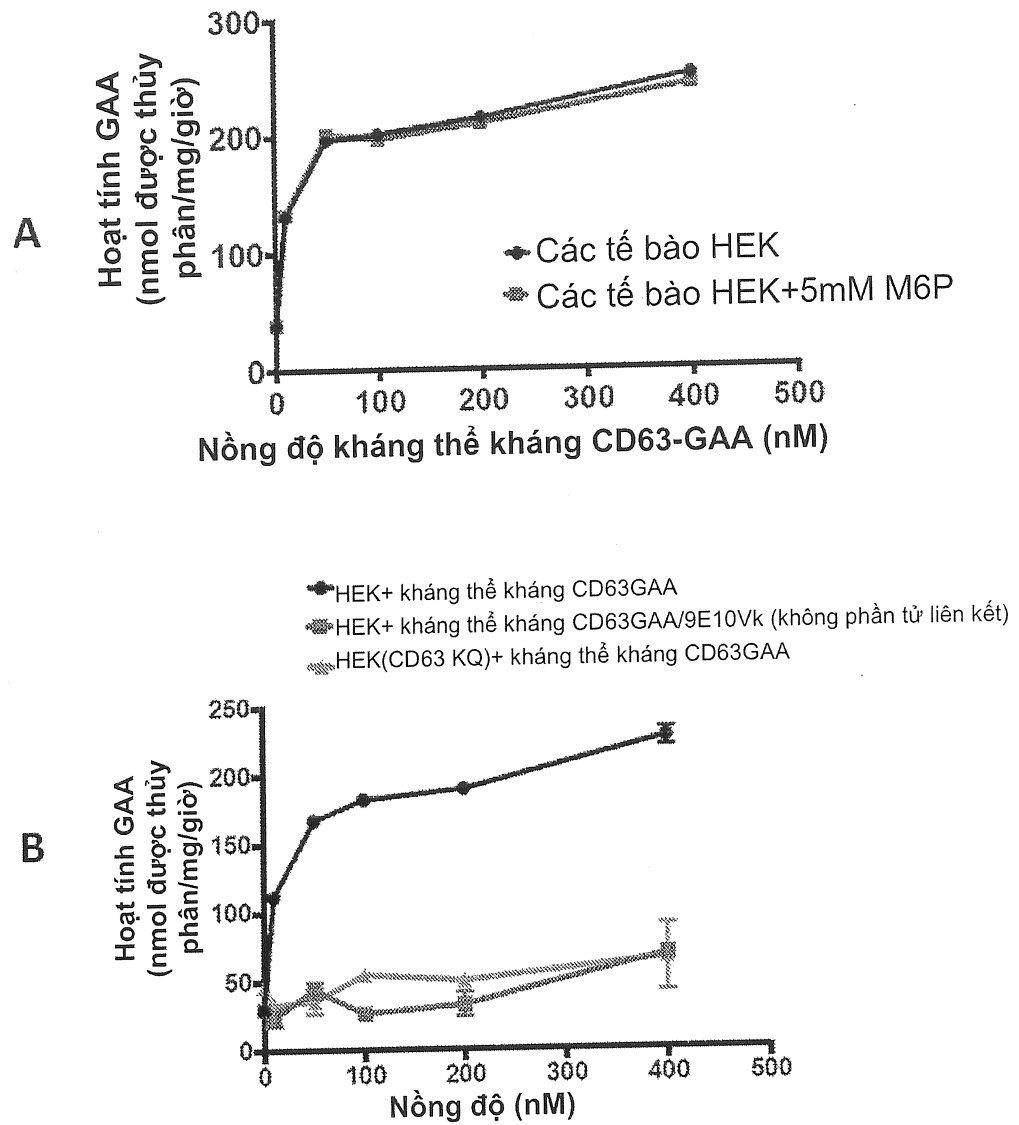
3/20

FIG. 3



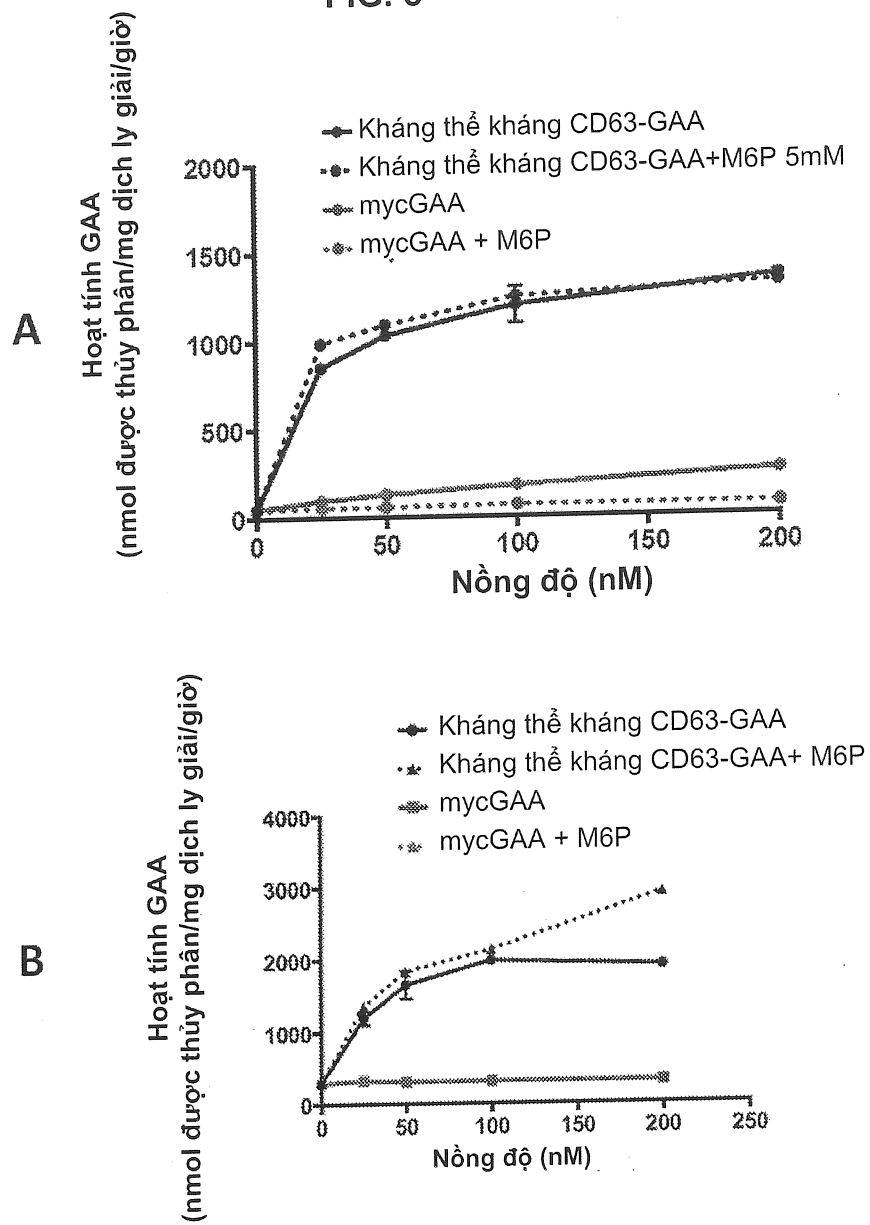
4/20

FIG. 4



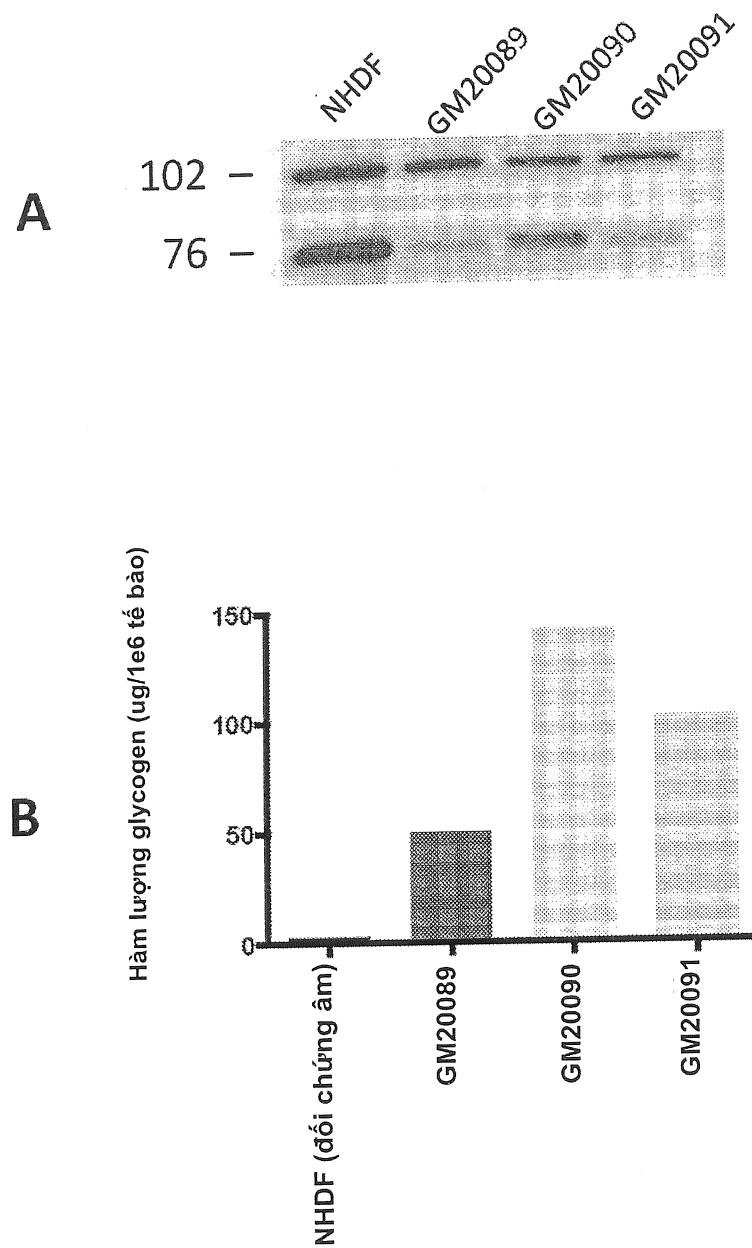
5/20

FIG. 5



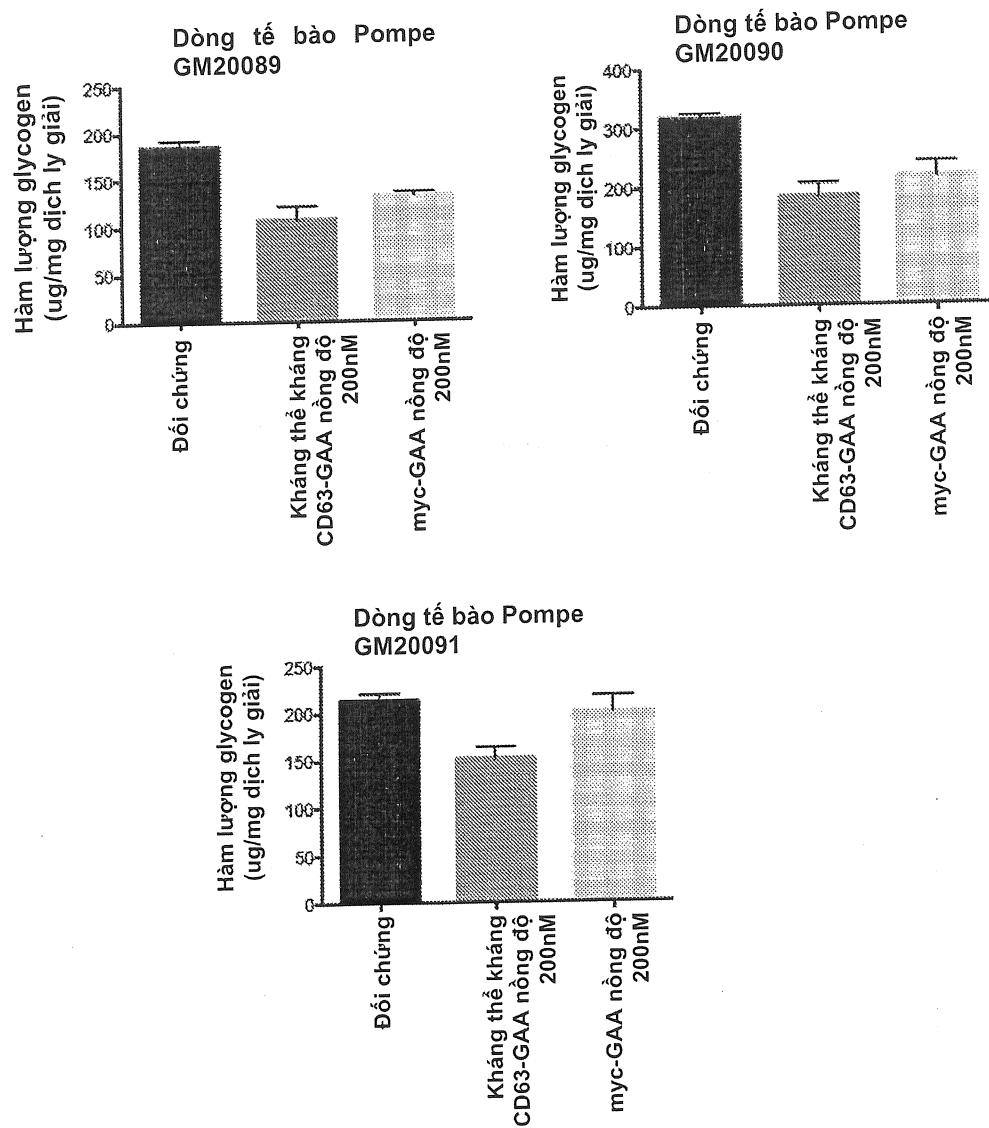
6/20

FIG. 6

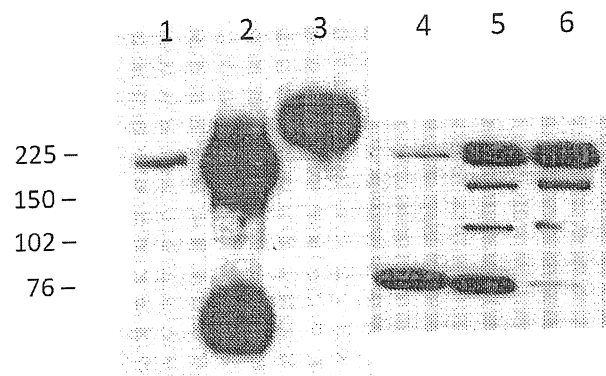


7/20

FIG. 7

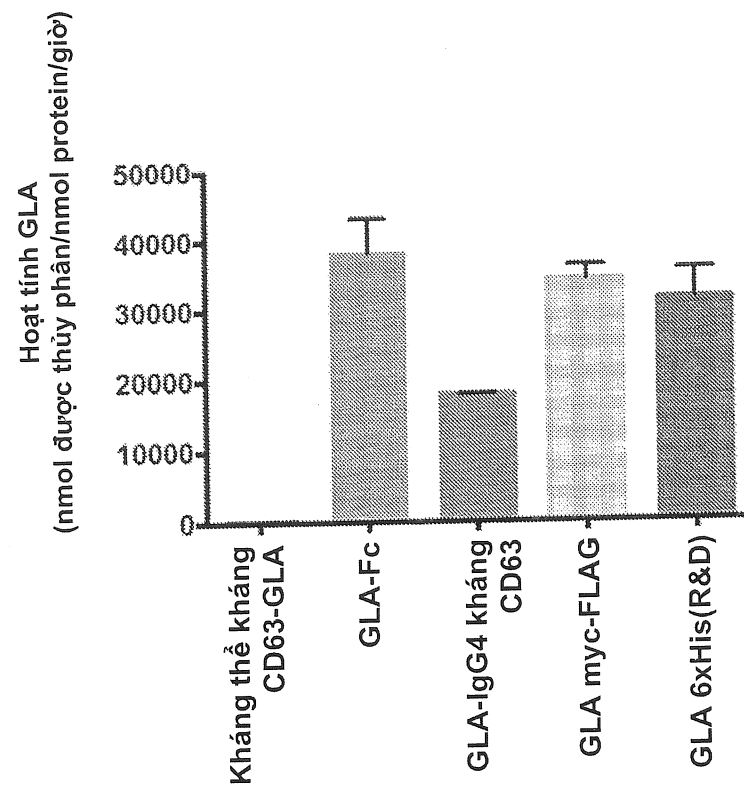


8/20

FIG. 8

9/20

FIG. 9



10/20

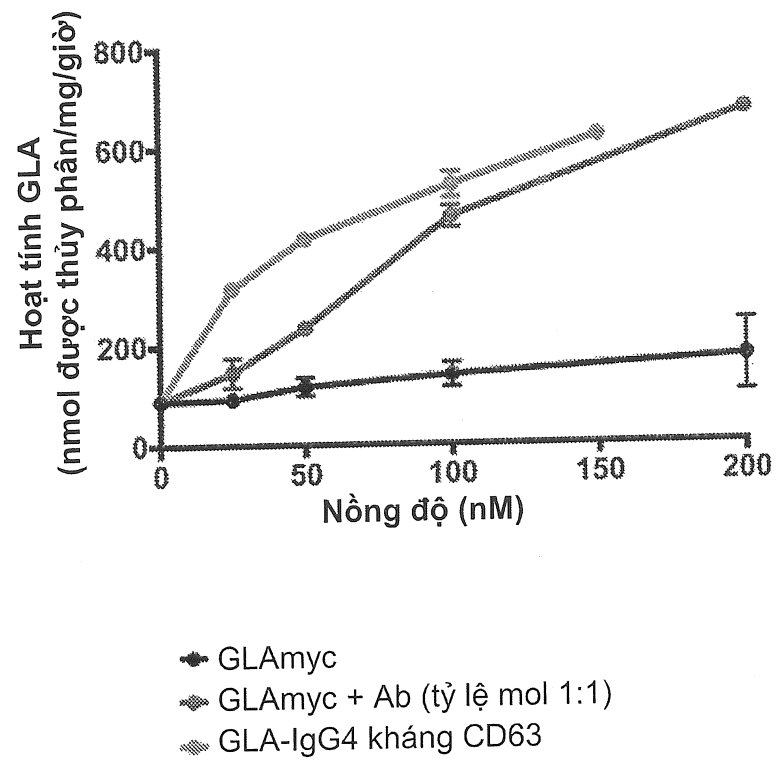
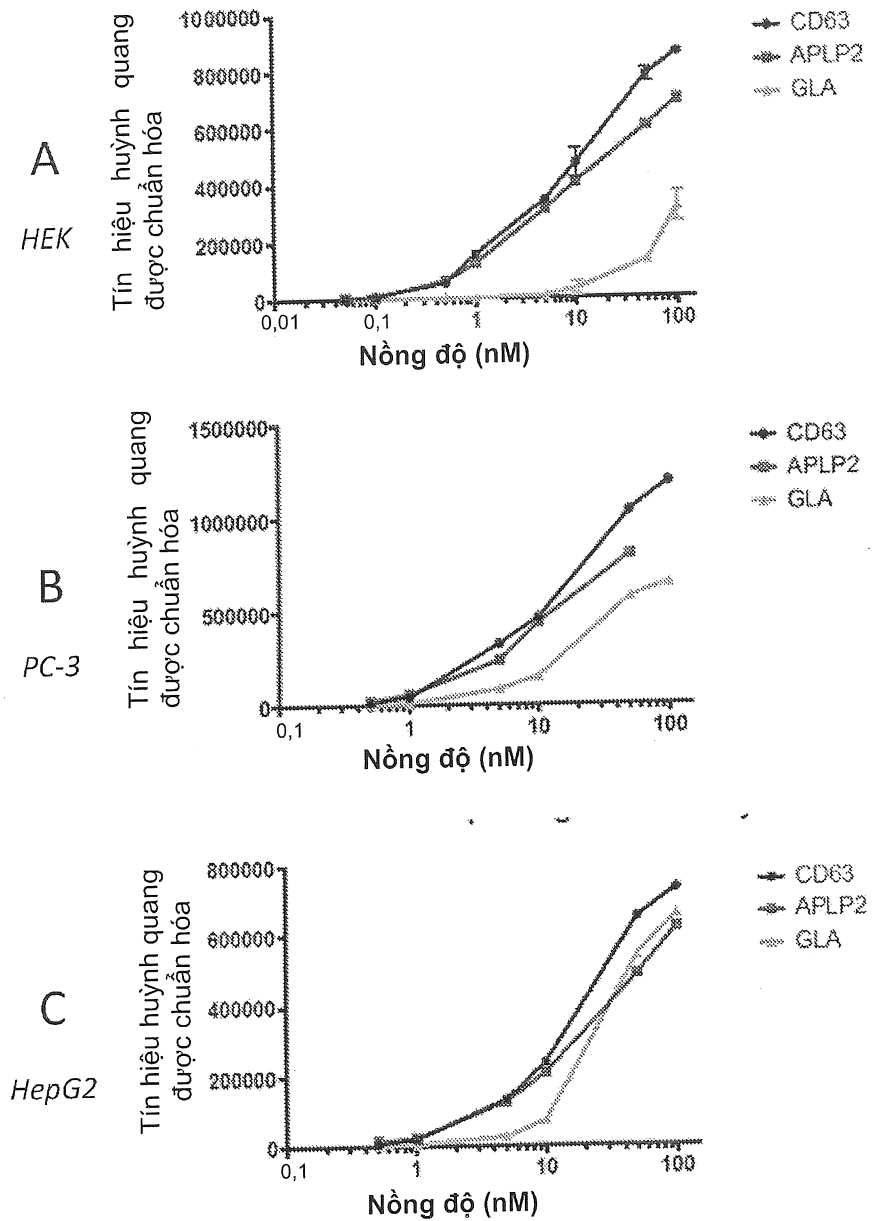


FIG. 10

11/20

FIG. 11



12/20

FIG. 12

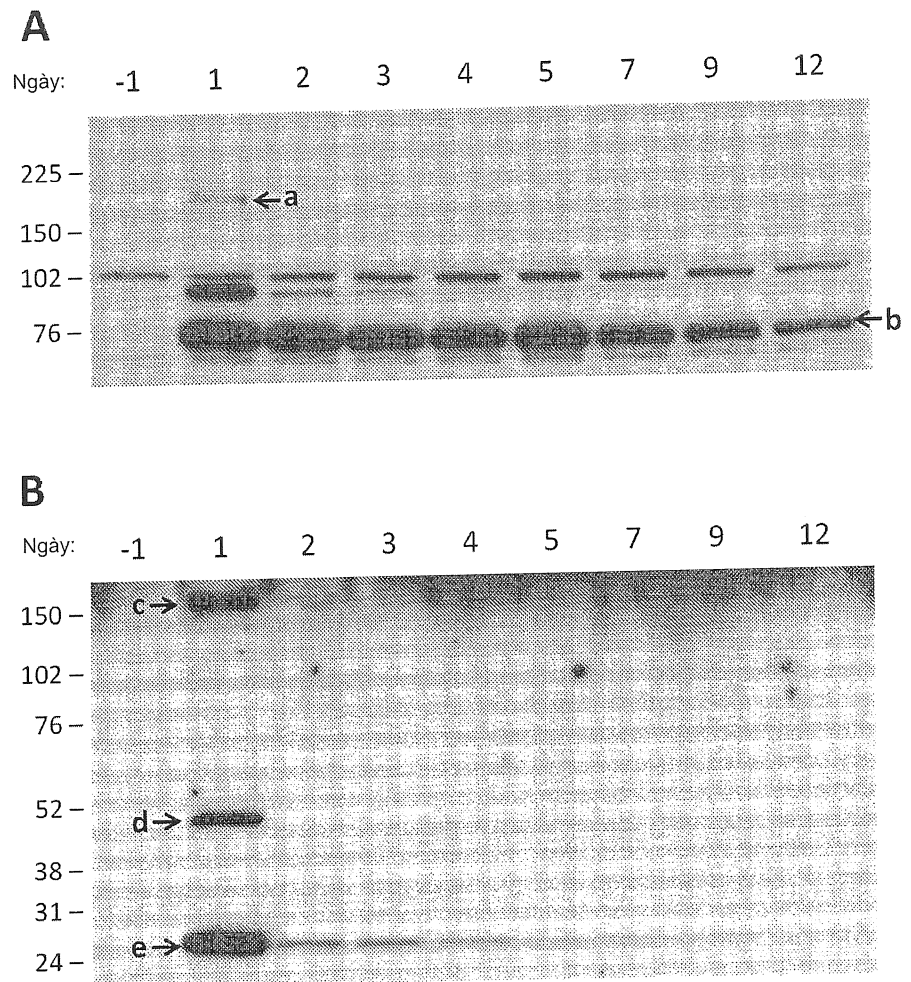


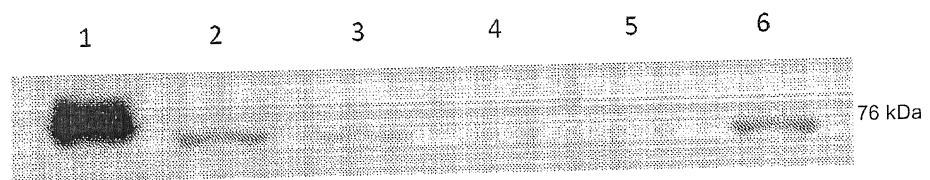
FIG. 13

FIG. 14

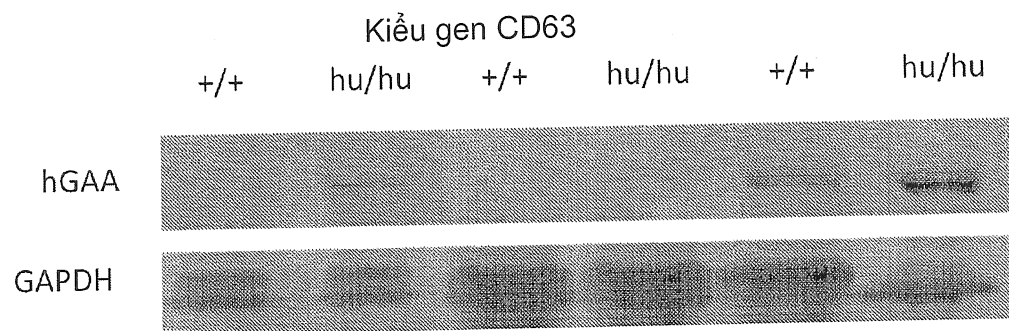


FIG. 15

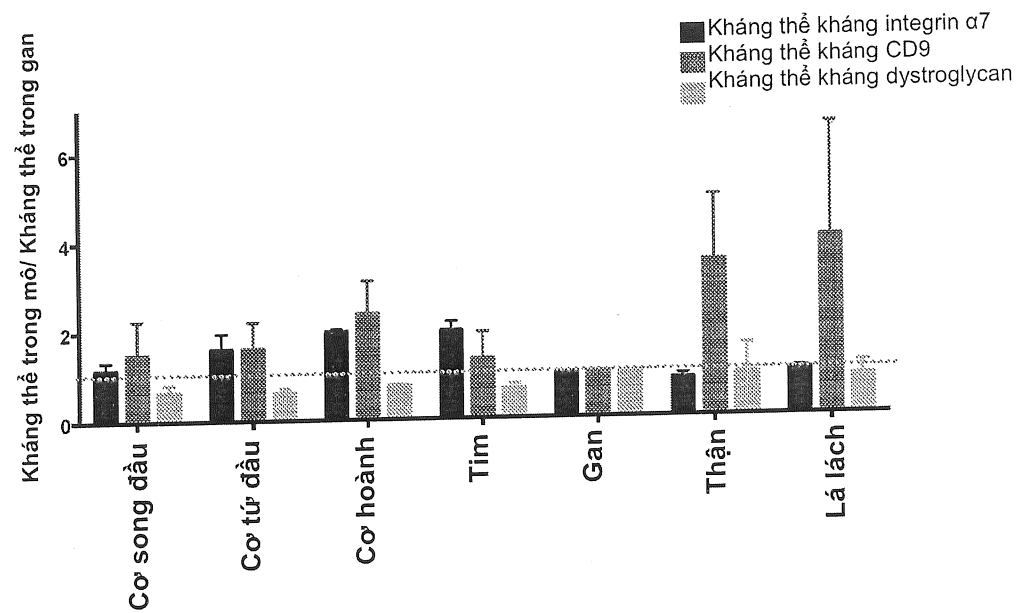
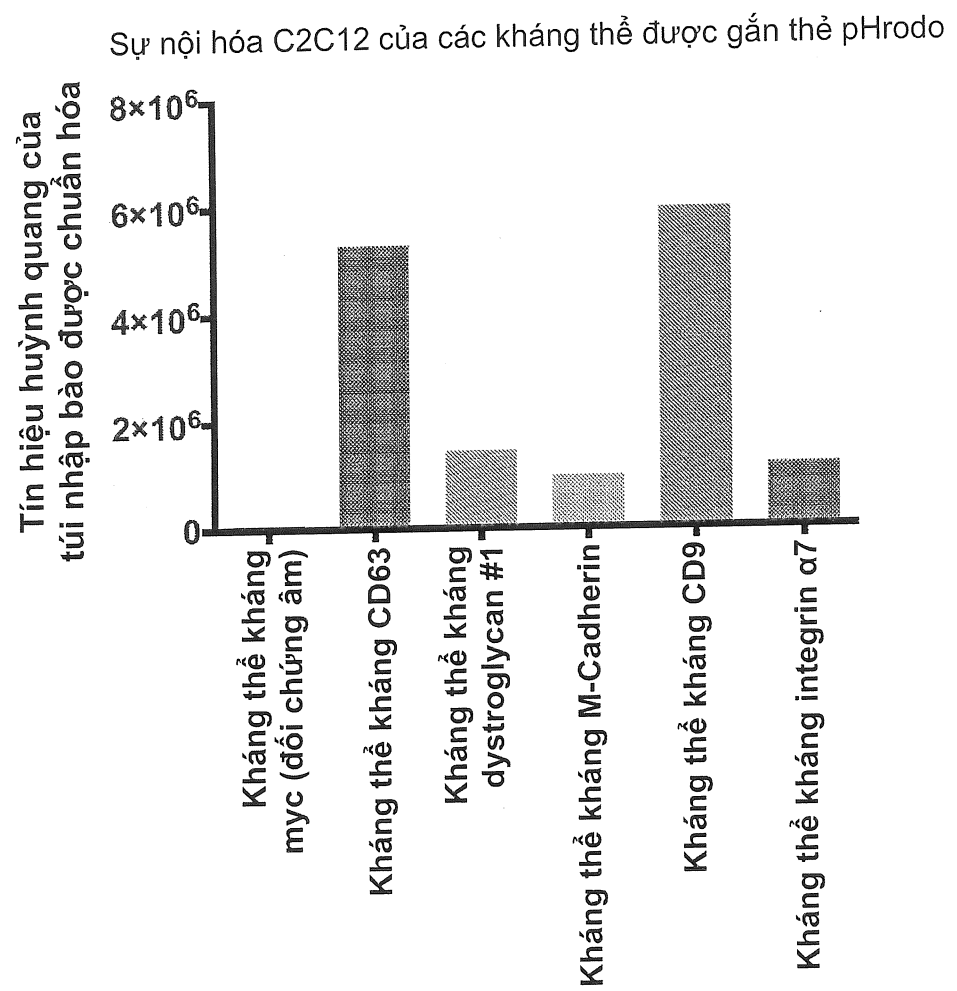


FIG. 16



17/20

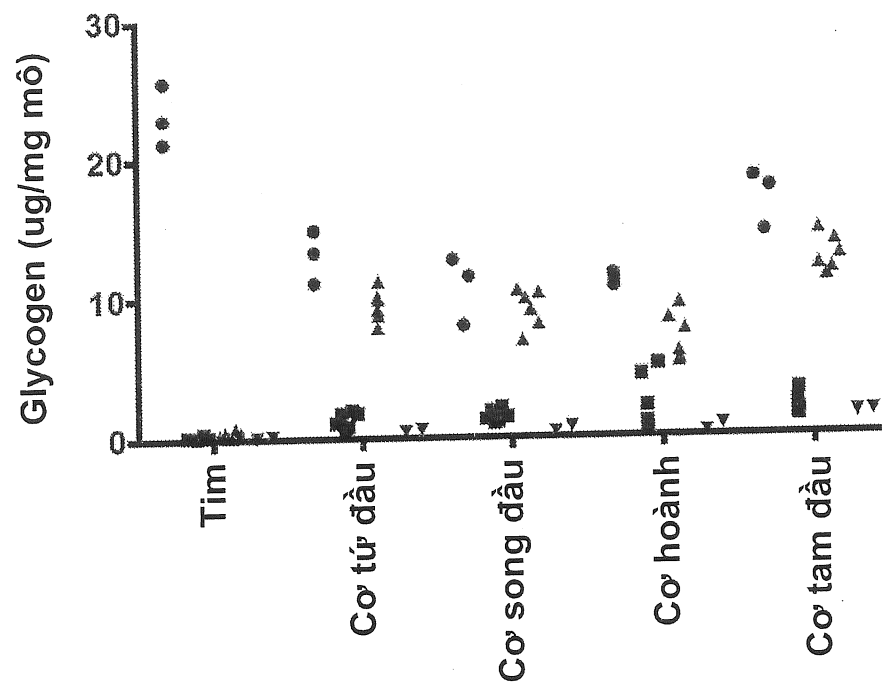


FIG. 17

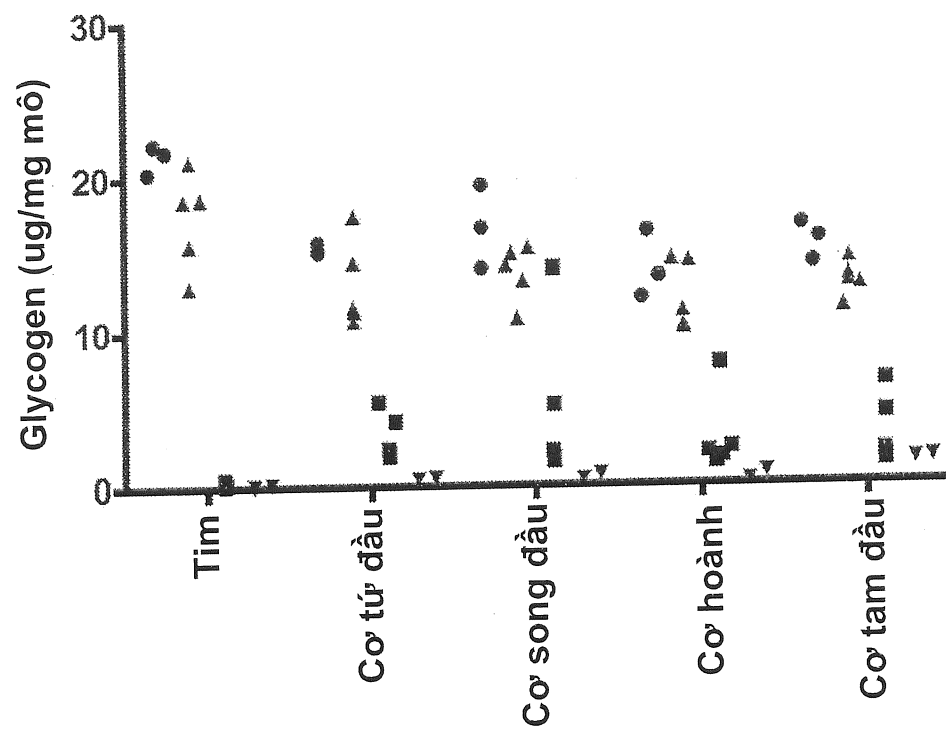


FIG. 18

19/20

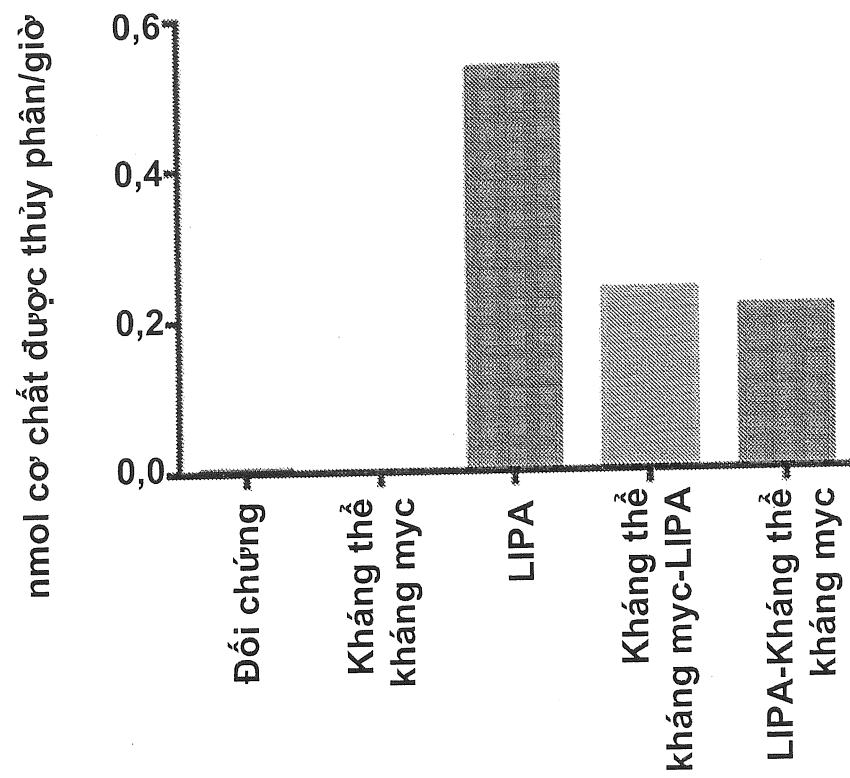


FIG. 19

20/20

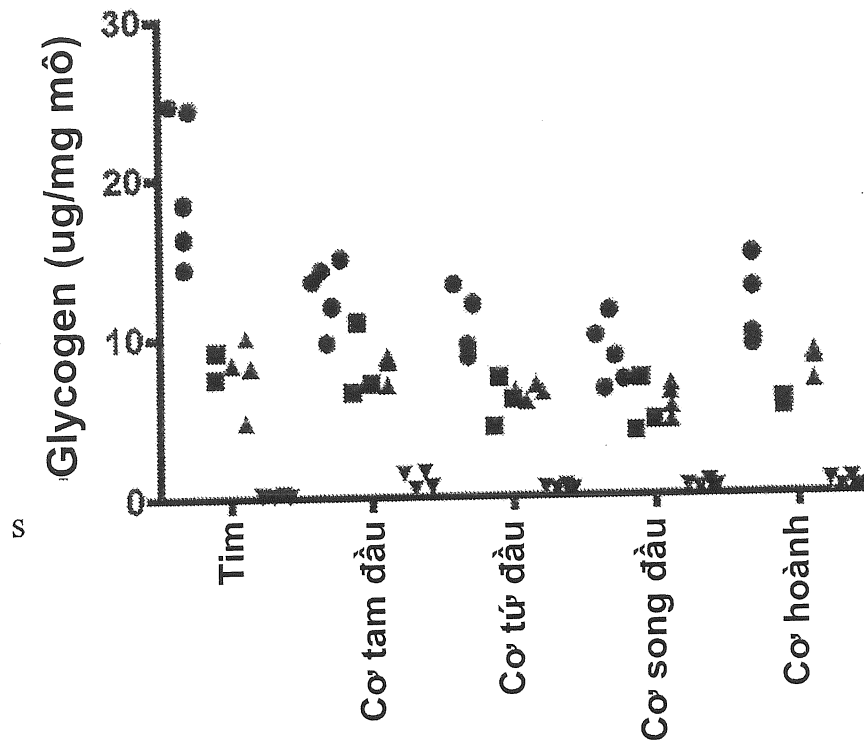


FIG. 20

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> CHẾ PHẨM VÀ PHỨC HỢP TRỊ LIỆU SINH HỌC ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH TÍCH TRỮ TRONG LYZOSOM

<130> 10109W001

<150> US 62/264,702

<151> 2015-12-08

<150> US 62/379,929

<151> 2016-08-25

<160> 1

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 883

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr
 405 410 415

Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp
 420 425 430

Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile
 435 440 445

Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys
 450 455 460

Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly
 465 470 475 480

Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu
 485 490 495

Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile
 500 505 510

Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val
 515 520 525

Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp
 530 535 540

Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro
 545 550 555 560

Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp
 565 570 575

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp
 580 585 590

Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu
 595 600 605

Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln
 610 615 620

Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu
 625 630 635 640

Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg
 645 650 655

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Cys