

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390894 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.06

(22) Дата подачи заявки
2021.11.15

(51) Int. Cl. A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТОГО С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТОМ БЕЛКА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОПАТИИ, СЧИТАЮЩЕЙСЯ СЛЕДСТВИЕМ БОЛЕЗНИ ФАБРИ ИЛИ АССОЦИИРОВАННОЙ С БОЛЕЗНЬЮ ФАБРИ

(31) 10-2020-0152246

(32) 2020.11.13

(33) KR

(86) PCT/KR2021/016629

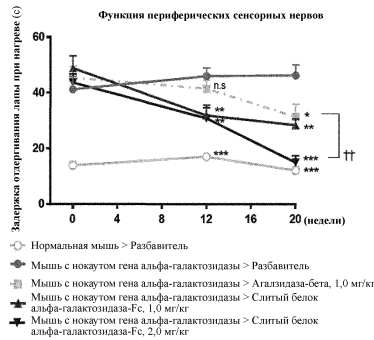
(87) WO 2022/103220 2022.05.19

(71) Заявитель:
ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ким Джин Ён, Пак Чо Рон, Ким Сан
Юн, Ким Вон Ки, Пак Су Ён (KR)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Изобретение относится к применению слитого белка на основе терапевтического фермента и Fc-области иммуноглобулина для предупреждения или облегчения нейропатии.



A1

202390894

202390894

A1

РСТ/KR2021/016629

МПК:

A61K 38/00 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01) *A61P 25/02* (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

**ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТОГО С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТОМ БЕЛКА
ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОПАТИИ, СЧИТАЮЩЕЙСЯ
СЛЕДСТВИЕМ БОЛЕЗНИ ФАБРИ ИЛИ АССОЦИИРОВАННОЙ С БОЛЕЗНЬЮ
ФАБРИ**

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению белка, слитого с ферментом, в том числе с терапевтическим ферментом, для предупреждения и лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри.

Предшествующий уровень техники

Нейропатия представляет собой заболевание, при котором в нервной системе возникают функциональные расстройства или патологические изменения, обусловленные различными причинами, такими как диабет, травма, аутоиммунные заболевания, почечные заболевания, опухоли, злоупотребление алкоголем, наследственное расстройство и так далее. Болезнь Фабри представляет собой наследственное заболевание, которое вызывает нейропатию и является одной из лизосомальных болезней накопления. Известно, что она вызывается накоплением Gb3 (глоботриаозилцерамида) и лизо-Gb3 (глоботриаозилсфингозин), обусловленным дефицитом или отсутствием активности альфа-галактозидазы, при котором происходит поражение нервной системы, приводящее в результате к различным симптомам, связанным с периферическими нервами (например, полинейропатии, нейропатии мелких волокон, нейропатической боли).

Альфа-галактозидаза представляет собой фермент, который катализирует расщепление Gb3 (глоботриаозилцерамида) и лизо-Gb3 до лактозилцерамида. Известно, что связанные с этим ферментом нарушения являются причиной аномального накопления Gb3 и лизо-Gb3 в стенках кровеносных сосудов и различных частях организма, что приводит к болезни Фабри. Когда в клетках, особенно в кластерах нейронов, называемых спинномозговым ганглием (DRG), происходит отложение Gb3 и лизо-Gb3 вследствие дефектов альфа-галактозидазы, возникают клеточные деформации,

такие как вакуолизация и т.д., что приводит к сенсорным и сенсорно-двигательным нарушениям. По этой причине у пациентов с болезнью Фабри наблюдается более высокое значение порога температурной чувствительности, сопровождающееся невыносимой периферической нейропатией, симптомами, связанными с вегетативной нервной системой и симптомами, связанными с центральной нервной системой, такими как покалывание или жжение.

В качестве способа лечения лизосомных болезней накопления, в том числе болезни Фабри, главным образом исследуют ферментозаместительную терапию (ERT) (Frances M. Platt et al., J. Cell Biol., 2012, Nov 26, 199(5): 723-34). В частности, поскольку болезнь Фабри представляет собой заболевание, вызываемое дефектом альфа-галактозидазы, принципиально важным является дополнительное лечение с использованием альфа-галактозидазы.

Однако, белки, демонстрирующие такие терапевтические эффекты, обычно легко денатурируют вследствие своей низкой стабильности и расщепляются под действием протеолитических ферментов крови, и поэтому для поддержания их уровней и активности в крови требуется часто вводить их пациентам. Тем не менее, частые инъекции для поддержания уровней в крови причиняют пациенту сильную боль. Для решения этих проблем необходимо повысить стабильность в крови терапевтического агента, применяемого в ферментозаместительной терапии, и разработать терапевтический агент, сохраняющий активность белка при поддержании высокого уровня лекарственного средства в крови в течение длительного промежутка времени.

Соответственно, возрастает важность разработки терапевтического агента, с использованием которого можно лечить нейропатию путем оказания защитного действия в отношении периферических сенсорных нервов, характеризующегося при этом большой продолжительностью пребывания в организме.

Описание

Техническая проблема

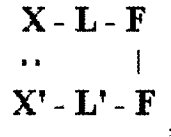
Существует потребность в разработке терапевтического агента, с использованием которого можно лечить нейропатию путем оказания защитного действия в отношении периферических сенсорных нервов.

Техническое решение

Цель настоящего изобретения заключается в разработке фармацевтической композиции для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с

болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1



где X и X' каждый представляет собой альфа-галактозидазу;

L и L' представляют собой линкеры, каждый из которых независимо является линкером одного и того же или другого вида;

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Другая цель настоящего изобретения заключается в разработке способа предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом способ включает стадию введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции индивиду, нуждающемуся в этом.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в предложении применения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри.

Полезные эффекты

Настоящее изобретение относится к применению слитого белка, содержащего терапевтический фермент, для предупреждения или ослабления нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри. Благодаря более высокой продолжительности пребывания в организме слитый с ферментом белок может быть с пользой применен для пациентов.

Описание графических материалов

На ФИГ. 1 показаны результаты сравнения терапевтических эффектов слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) и агалзидазы-бета в отношении нейропатии; и

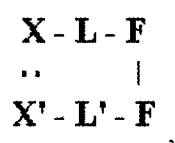
на ФИГ. 2 показано изменение числа вакуолизованных нервных клеток в спинномозговых ганглиях под действием слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) и агалзидазы-бета.

Наилучший вариант осуществления изобретения

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок, в котором объединены терапевтический фермент и Fc-область иммуноглобулина.

Фармацевтическая композиция по одному конкретному воплощению характеризуется тем, что слитый с ферментом белок представляет собой слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1



где X и X' каждый представляет собой альфа-галактозидазу;

L и L' представляют собой линкеры, каждый из которых независимо является линкером одного и того же или другого вида;

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фермент представляет собой антипараллельный димер, образованный с использованием X и X'.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина является негликозилированной.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина происходит из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина происходит из Fc-области IgG.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина происходит из Fc-области IgG4.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина происходит из негликозилированной Fc-области, происходящей из человеческого IgG4.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из (а) константного домена 1 тяжелой цепи (СН1), СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена; (б) СН1-домена и СН2 домена; (в) СН1-домена и СН3-домена; (г) СН2-домена и СН3-домена; и (д) комбинации одного домена либо двух или более доменов из СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена и шарнирной области иммуноглобулина или части шарнирной области иммуноглобулина.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина содержит замену аминокислоты в положении 2 на пролин; замену аминокислоты в положении 71 на глутамин; или замену аминокислоты в положении 2 на пролин и замену аминокислоты в положении 71 на глутамин в Fc-области иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина содержит мономер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что линкер состоит из аминокислот числом от 1 до 100 аминокислот.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности [GS]_x, [GGGS]_x или [GGGGS]_x, где x равно одному из натуральных чисел от 1 до 20.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что нейропатия представляет собой полинейропатию или нейропатию мелких волокон.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическая композиция оказывает защитное действие в отношении периферических сенсорных нервов.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическая композиция подавляет вакуолизацию клеток спинномозгового ганглия (DRG).

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что частота введения слитого с ферментом белка индивиду, нуждающемуся в этом, снижена по сравнению с таковой для фермента, не являющегося слитым белком.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическую композицию вводят индивиду один раз каждые 2 недели или один раз в месяц.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что слитый с ферментом белок содержит мономер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что слитый с ферментом белок представляет собой димер, образованный из мономеров, в котором одна молекула альфа-галактозидазы и одна молекула Fc-области иммуноглобулина соединены через пептидный линкер.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что X и X' представляют собой ферменты, каждый из которых содержит одинаковую аминокислотную последовательность или отличающиеся друг от друга последовательности.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом способ включает стадию введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции индивиду, нуждающемуся в этом.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для приготовления

профилактического или терапевтического агента в случае последствий нейропатии, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри.

Способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение будет подробно описано ниже. Что касается каждого описания и воплощения, раскрытых в этом изобретении, то они также могут быть применимы для раскрытия других описаний и воплощений. То есть, все комбинации различных компонентов, раскрытых в этом изобретении, попадают в объем настоящего изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не ограничивается приведенным ниже конкретным описанием.

Кроме того, специалистам в данной области техники будут известны, или они могут быть способны выявить, используя только традиционные методы экспериментирования, многие эквивалентные варианты конкретных воплощений этого изобретения, описанных в данной заявке. Кроме того, подразумевается, что такие эквивалентные варианты попадают в объем настоящего изобретения.

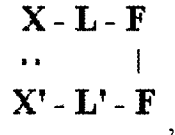
По всему тексту описания использованы не только общепринятые однобуквенные или трехбуквенные коды для природных аминокислот, но также и такие трехбуквенные коды, как Aib (α -аминоизомасляная кислота), Sar (N-метилглицин) и т.д., обычно используемые для других аминокислот. Помимо этого, аминокислоты, упомянутые в данном описании в сокращенном виде, приведены в соответствии с правилами номенклатуры по IUPAC-IUB (Международный союз по теоретической и прикладной химии/Международный биохимический союз).

Аланин	A	Аргинин	R
Аспарагин	N	Аспарагиновая кислота	D
Цистеин	C	Глутаминовая кислота	E
Глутамин	Q	Глицин	G
Гистидин	H	Изолейцин	I
Лейцин	L	Лизин	K
Метионин	M	Фенилаланин	F
Пролин	P	Серин	S
Треонин	T	Триптофан	W

Тирозин Y Валин V

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1



где X и X' каждый представляет собой альфа-галактозидазу;

L и L' представляют собой линкеры, каждый из которых независимо является линкером одного и того же или другого вида;

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

В одном из воплощений фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый разбавитель и слитый с ферментом белок, представленный химической формулой 1, в фармацевтически эффективном количестве. Используемый в данном описании термин «фармацевтически эффективное количество» означает безопасную дозировку слитого с ферментом белка, при которой не наблюдается проявления токсичности или побочных эффектов у пациентов с оказанием при этом профилактического или терапевтического действия в отношении нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, конкретно, дозировку, при которой наблюдается защитное действие в отношении периферических сенсорных нервов или достигается эффект подавления вакуолизации клеток спинномозгового ганглия (DRG), но этим не ограничивается.

Используемый в данном описании термин «слитый с ферментом белок» означает белок, в котором Fc-область иммуноглобулина слита с терапевтическим ферментом таким образом, что терапевтический фермент может сохранять свою активность при одновременном снижении аффинности его связывания с рецепторами лизосом вследствие наличия слияния с Fc-областью иммуноглобулина, в результате чего увеличивается его время полужизни в крови по сравнению с терапевтическим ферментом, не слитым с Fc-областью иммуноглобулина. Слитый с ферментом белок по

настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства для ферментозаместительной терапии (ERT). Применяя ферментозаместительную терапию, можно предотвращать или лечить заболевание посредством восстановления ухудшенной функции фермента путем восполнения дефектного или дефицитного фермента, вызывающего заболевание.

Авторами настоящего изобретения получен слитый с Fc-областью иммуноглобулина белок для увеличения времени полужизни терапевтических ферментов в крови. Fc-область, включенная в слитый с ферментом белок по настоящему изобретению, может представлять собой Fc-область IgG4, где с целью подавления гликозилирования выполнена замена в последовательности возможного гликозилирования и, кроме того, выполнена замена в последовательности шарнирной области в Fc IgG4 с целью подавления обмена цепями, но этим не ограничивается.

В химической формуле 1 группировка F, которая представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, Fc-область IgG4, где выполнена замена в последовательности шарнирной области), может быть соединена с терапевтическим ферментом посредством линкера с образованием мономера, и данный мономер может образовывать димер совместно с мономером, содержащим другую Fc-область иммуноглобулина и терапевтический фермент. Что касается димера, то димер может быть образован посредством ковалентной связи между Fc-областями иммуноглобулинов и посредством ковалентной или нековалентной связи между терапевтическими ферментами, но этим не ограничивается. В частности, было подтверждено, что, если терапевтический фермент, подлежащий слиянию с Fc-областью иммуноглобулина, образует димер, в частности, антипараллельный димер, то продолжительность его существования *in vivo* увеличивается при сохранении ферментативной активности. Таким образом, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению обладает преимуществом в плане повышенной стабильности по сравнению с терапевтическим ферментом, не слитым с Fc-областью.

Использованный в данном описании термин «терапевтический фермент» относится к ферменту для лечения заболеваний, возникающих вследствие недостатка, дефицита, нарушения функционирования и т.д. ферментов, и относится к ферменту, с использованием которого можно лечить индивида с заболеваниями посредством ферментозаместительной терапии, введения ферментов и так далее. Терапевтический фермент, который может быть включен в состав слитого с ферментом белка по

настоящему изобретению, конкретно не ограничен, и в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению может быть включен любой терапевтический фермент, при условии, что он является терапевтическим ферментом, позволяющим получать преимущества благодаря большей продолжительности его существования *in vivo*, чем у терапевтического фермента в неслитой форме. В одном из воплощений настоящего изобретения слитый с ферментом белок представляет собой слитый с терапевтическим ферментом белок.

В настоящем изобретении терапевтический фермент может представлять собой альфа-галактозидазу.

Терапевтический фермент, включенный в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, может образовывать димер посредством нековалентной связи, но этим не ограничивается. В частности, терапевтический фермент также может образовывать димер, когда слитый белок экспрессируется в трансформанте, и Fc-область иммуноглобулина образует димер.

Такой димер терапевтических ферментов может представлять собой димер, образованный двумя ферментами, которые являются одинаковыми, или димер, образованный двумя ферментами, которые отличаются друг от друга. Конкретные виды ферментов, составляющих димер, не ограничиваются, при условии, что эти ферменты обладают желаемой активностью *in vivo*.

При этом такие терапевтические ферменты, составляющие димер, могут быть в форме параллельного димера или антипараллельного димера в зависимости от направления, в котором они соединяются, но этим не ограничиваются. В качестве конкретного примера, что касается фермента в химической формуле 1, то X и X' могут образовывать антипараллельный димер, но этим не ограничиваются.

В одном типичном воплощении настоящего изобретения получали слитый белок, в котором альфа-галактозидаза в качестве терапевтического фермента была слита с Fc-областью иммуноглобулина, и было подтверждено, что альфа-галактозидазы образуют антипараллельный димер посредством нековалентной связи, при этом Fc-области иммуноглобулинов слитого белка образуют димер (пример 1).

Использованный в данном описании термин «параллельный димер» означает, что N-конец и C-конец аминокислотной последовательности каждого мономера участвуют в образовании димера, располагаясь в одном направлении, когда в образовании димера

участвует каждый из мономеров. При этом димер может образовываться посредством нековалентной связи или ковалентной связи, но этим не ограничивается.

Использованный в данном описании термин «антипараллельный димер» означает, что N-конец и C-конец аминокислотной последовательности каждого мономера участвуют в образовании димера, располагаясь в противоположных направлениях по отношению друг к другу, когда в образовании димера участвует каждый из мономеров. При этом димер может образовываться посредством нековалентной связи или ковалентной связи, но этим не ограничивается.

То есть, возможно, что в слитом с ферментом белке по настоящему изобретению (1) N-конец одного терапевтического фермента (X) и N-конец другого терапевтического фермента (X') могут участвовать в образовании димера, располагаясь в одном направлении, (2) C-конец одного терапевтического фермента (X) и C-конец другого терапевтического фермента (X') могут участвовать в образовании димера, располагаясь в одном направлении, (3) N-конец одного терапевтического фермента (X) и C-конец другого терапевтического фермента (X') могут участвовать в образовании димера, располагаясь в одном направлении, или (4) C-конец одного терапевтического фермента (X) и N-конец другого терапевтического фермента (X') могут участвовать в образовании димера, располагаясь в одном направлении. Димеры в случаях (1) и (2) называются параллельными димерами, а димеры в случаях (3) и (4) называются антипараллельными димерами. Образование этих димеров может происходить посредством ковалентной связи или нековалентной связи, но этим не ограничивается.

В частности, при образовании вышеупомянутых димеров образование параллельного или антипараллельного димера может происходить таким образом, что как только Fc-области иммуноглобулинов образуют димер, соединенная с ними альфа-галактозидаза мономеров образует димер посредством ковалентной связи или нековалентной связи.

Фермент, включенный в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, может представлять собой альфа-галактозидазу. С учетом целей настоящего изобретения слитый с ферментом белок может включать димерный терапевтический фермент, в частности, димер, образованный альфа-галактозидазой, или димер, образованный альфа-галактозидазой и другим терапевтическим ферментом, но этим не ограничивается. Пример слитого белка по настоящему изобретению может включать слитый белок, где в химической формуле 1 X и X' могут быть альфа-

галактозидазами, и аминокислотные последовательности X и X' могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, как X, так и X' могут представлять собой природные альфа-галактозидазы или одна из X и X' может представлять собой природную альфа-галактозидазу, а другая может представлять собой вариант, в котором часть последовательности природной альфа-галактозидазы модифицирована, но этим не ограничиваясь. Альтернативно, X и X' могут представлять собой варианты альфа-галактозидаз, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, но этим не ограничиваются.

Использованный в данном описании термин «альфа-галактозидаза (α -GAL) или альфа-галактозидаза A (α -GAL A)» относится к ферменту, присутствующему в лизосомах селезенки, головного мозга, печени и т.д., который катализирует гидролиз концевых альфа-галактозильных группировок в гликолипидах и гликопротеинах и представляет собой гомодимерный гликопротеин. В частности, известно, что альфа-галактозидаза катализирует гидролиз церамид-тригексозида и гидролиз мелибиозы до галактозы и глюкозы и, в частности, известно, что она ассоциирована с болезнью Фабри, которая является лизосомной болезнью накопления.

В настоящем изобретении альфа-галактозидаза может включать рекомбинантную форму агалзидазы-альфа или агалзидазы-бета, и в объем настоящего изобретения может быть включен любой фермент без ограничения в отношении его последовательности, происхождения, способа получения и т.д., при условии, что фермент представляет собой фермент, проявляющий эквивалентные ей активность и терапевтическое действие. Конкретно, альфа-галактозидаза может кодироваться полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 и может содержать или может (по существу) состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, но этим не ограничивается. Альтернативно, альфа-галактозидаза по настоящему изобретению может включать аминокислотную последовательность, имеющую 60%, 70%, 80% или более, 90% или более, более конкретно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% либо 99% или более гомологии с природной альфа-галактозидазой или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, но этим не ограничивается.

Хотя в настоящем изобретении пептид описан как пептид, «состоящий из» последовательности с конкретным порядковым номером, при условии, что данный пептид обладает активностью, идентичной или эквивалентной таковой у пептида, состоящего из данной аминокислотной последовательности с соответствующим

порядковым номером, очевидно, что это не исключает добавления не являющейся смысловой последовательности перед аминокислотной последовательностью или после аминокислотной последовательности с соответствующим порядковым номером, наличия природной мутации или молчащей мутации, и такое добавление или такая мутация в последовательности включены в объем настоящего изобретения. Другими словами, даже при наличии различия в некоторых последовательностях, при условии, что она показывает гомологию на предварительно заданном уровне или более высоком уровне и проявляет активность, эквивалентную или аналогичную таковой у природной альфа-галактозидазы, она может попадать в объем настоящего изобретения.

Использованный в данном описании термин «гомология» или «идентичность» относится к степени соответствия между двумя указанными аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями, которая может быть выражена в процентном отношении.

Термины «гомология» и «идентичность» часто могут быть использованы взаимозаменяемо.

Имеют ли любые две пептидные последовательности гомологию, сходство или идентичность, можно определить, применяя известные компьютерные алгоритмы, такие как программа в формате «FASTA», например, использующая параметры по умолчанию, описанные в работе Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444. Альтернативно, это можно определить, используя алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48: 443-453), который реализован в программе Нидлмана из Европейского пакета открытого программного обеспечения по молекулярной биологии (EMBOSS) (Rice et al., 2000, Trends Genet., 16: 276-277) (версия 5.0.0 или более поздние версии) (в том числе пакет программ GCG (Devereux J., et al., Nucleic Acids Research, 12: 387 (1984)), BLASTP (средство поиска основного локального выравнивания (BLAST) для белков), BLASTN (BLAST для нуклеотидов), FASTA (Atschul S.F. et al., J. Molec. Biol., 215: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, Ed., Academic Press, San Diego, 1994, и Carillo et al., (1988) SIAM J. Applied Math., 48: 1073). Например, для определения гомологии, сходства или идентичности можно использовать BLAST из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) или ClustalW (кластерный анализ W множественных выравниваний).

Гомологию, сходство или идентичность пептидов можно определить путем сравнения информации о последовательностях, используя, например, компьютерную

программу GAP, например, Needleman et al. (1970), J. Mol. Biol., 48: 443, которая анонсирована в Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., (1981) 2: 482. Кратко, с использованием программы GAP гомологию, сходство или идентичность можно определить в виде значения, полученного в результате деления числа аналогично выравненных символов (а именно, аминокислот) на общее число данных символов в более короткой из этих двух последовательностей. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать (1) единичную матрицу сравнения (содержащую значения 1 в случае идентичности и 0 в случае отсутствия идентичности) и матрицу взвешенного сравнения согласно Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res., 14: 6745 (или матрицу замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4)), описанную в Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) штраф 3,0 за каждый разрыв и дополнительный штраф 0,10 за каждый символ в каждом разрыве (или штраф за внесение разрыва 10 и штраф за удлинение разрыва 0,5); и (3) отсутствие штрафа за внесение концевых разрывов. Таким образом, термин «гомология» или «идентичность», использованный в данном описании, указывает на соответствие между последовательностями.

Информацию о последовательностях терапевтических ферментов или их производных и кодирующих их нуклеотидных последовательностях можно получить из известной базы данных, например, NCBI и так далее.

Терапевтический фермент по настоящему изобретению может представлять собой нативный фермент, и фрагмент, состоящий из части нативного фермента, или аналог терапевтического фермента, где произошло изменение, выбранное из группы, состоящей из замены, добавления, делеции и модификации некоторых аминокислот и их комбинации, может быть включен в настоящее изобретение без ограничения, при условии, что он обладает активностью, эквивалентной таковой у нативного терапевтического фермента.

Использованный в данном описании термин «фрагмент» относится к форме, в которой удалены одна или несколько аминокислот на амино- или карбокси-конце нативного терапевтического фермента или аналога нативного терапевтического фермента. Любой фрагмент принадлежит объему настоящего изобретения независимо от размера фрагмента или вида подлежащих удалению аминокислот, при условии, что эти фрагменты обладают активностью данного терапевтического фермента.

Кроме того, аналог терапевтического фермента включает все аналоги, когда к амино- и/или карбокси-концу нативного терапевтического фермента добавлены одна или несколько аминокислот.

Кроме того, аналог терапевтического фермента может быть таким, у которого заменены или добавлены один или несколько аминокислотных остатков в последовательности нативного терапевтического фермента. Замененными или добавленными аминокислотами могут быть не только 20 аминокислот, обычно встречающихся в белках человека, но также и нетипичные или неприродные аминокислоты. Коммерческие источники нетипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, ChemPer Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, в состав которых входят эти аминокислоты, и нетипичные последовательности пептидов могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например, у American Peptide Company, Bachem (США) или Anygen (Корея), но конкретно этим не ограничиваются.

Аналоги терапевтических ферментов могут включать биоаналоги и улучшенные варианты соответствующих терапевтических ферментов. Например, что касается биоаналогов, то с учетом разницы в экспрессии в организме хозяина по сравнению с известным терапевтическим ферментом, разницы в характеристике и степени его гликозилирования, а также разницы в степени замены в конкретном аминокислотном остатке соответствующего фермента в свете стандартной последовательности, когда степень замены не равна замене на 100%, они относятся к ферментам-биоаналогам, которые могут быть использованы в качестве слитого с ферментом белка по настоящему изобретению. Терапевтические ферменты могут быть получены или произведены известным в данной области техники методом, конкретно, путем генетической рекомбинации в клетках животных, *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых, растительных клетках, в живых животных и т.д., и способ получения этим не ограничивается, и имеющиеся в продаже терапевтические ферменты могут быть приобретены и использованы, но ими не ограничиваются.

Терапевтический фермент может быть получен или произведен известным в данной области техники методом, и, конкретно, фермент может быть очищен из культуры после культивирования клеток животных, в которые встроены экспрессирующий в клетках животных вектор, или может быть использован после приобретения имеющихся в продаже ферментов, но этим не ограничивается.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может представлять собой белок, в котором терапевтический фермент и Fc-область иммуноглобулина слиты через пептидный линкер. Другими словами, L или L' в химической формуле 1 может представлять собой пептидный линкер, но этим, в частности, не ограничивается, при условии, что его можно использовать для слияния Fc-области иммуноглобулина с терапевтическим ферментом.

Пептидный линкер может содержать одну или более чем одну аминокислоту, например, от 1 аминокислоты до 1000 аминокислот, от 1 аминокислоты до 500 аминокислот, от 1 аминокислоты до 100 аминокислот или от 1 аминокислоты до 50 аминокислот, и любой пептидный линкер, известный в данной области техники, в том числе, например, линкер [GS]_x, линкер [GGGS]_x и линкер [GGGGGS]_x и т.д., где x равно натуральному числу 1 или выше (например, 1, 2, 3, 4, 5 или выше), и, в качестве конкретного примера, x может быть равно натуральному числу от 1 до 20, но этим не ограничивается. Конкретно, пептидный линкер по настоящему изобретению может состоять из последовательностей длиной 10-50 аминокислот, более конкретно, последовательностей длиной 20-40 аминокислот и может состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

С учетом целей настоящего изобретения то положение, в котором пептидный линкер слит с терапевтическим ферментом и Fc-областью иммуноглобулина, не ограничивается, при условии, что пептидный линкер может быть использован для присоединения терапевтического фермента к Fc-области иммуноглобулина с сохранением при этом активности терапевтического фермента. Конкретно, данное положение может находиться на обоих концах терапевтического фермента и Fc-области иммуноглобулина, и более конкретно, данное положение может находиться на С-конце терапевтического фермента и N-конце Fc-области иммуноглобулина, но этим не ограничивается.

Использованные в данном описании термины «N-конец» и «С-конец» относятся к амино-концу и карбокси-концу белка, соответственно. Например, N-конец или С-конец может включать, но не ограничивается этим, не только самый концевой аминокислотный остаток на N-конце или С-конце, но также и аминокислотные остатки вблизи N-конца или С-конца и, конкретно, участок от 1-ого аминокислотного остатка до 20-ого аминокислотного остатка от самого конца.

В одном типичном воплощении настоящего изобретения слитый белок (SEQ ID NO: 13), в котором N-конец Fc-области IgG4 слит с C-концом терапевтического фермента, получали путем синтеза, в результате которого слияние альфа-галактозидазы в качестве терапевтического фермента и линкера-IgG4 происходило на генетическом уровне, и подтверждали экспрессию слитого белка в трансформанте, который был трансфицирован этим слитым белком (пример 1).

В качестве одного конкретного примера, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может содержать мономер, который образуется в результате присоединения альфа-галактозидазы к Fc-области иммуноглобулина посредством ковалентной связи через пептидный линкер, при этом димер может образовываться посредством ковалентной связи между Fc-областями иммуноглобулинов и посредством ковалентной или нековалентной связи между терапевтическими ферментами в этих двух мономерах, но этим не ограничивается.

В качестве другого конкретного примера, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может содержать мономер, содержащий или (по существу) состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, или он может иметь димерную структуру, которая образуется из мономеров, но этим не ограничивается.

В настоящем изобретении пептидные линкеры могут быть соответственно присоединены к димерной Fc-области иммуноглобулина, образованной мономерными Fc-областями иммуноглобулинов, при этом линкеры, присоединенные к соответствующим Fc-областям иммуноглобулинов могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Использованный в данном описании термин «Fc-область иммуноглобулина» относится к области иммуноглобулина, содержащей константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и/или константную область 3 тяжелой цепи (CH3), не включающей переменные области тяжелой цепи и легкой цепи. С учетом целей настоящего изобретения такая Fc-область может содержать модифицированную шарнирную область, но этим не ограничивается. В частности, Fc-область иммуноглобулина может иметь изменение, выбранное из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации по меньшей мере в одной аминокислоте нативной Fc-области иммуноглобулина, но этим не ограничивается.

Кроме того, в настоящем изобретении F в химической формуле 1 слитого с ферментом белка может представлять собой Fc-область иммуноглобулина,

происходящую из IgG, конкретно, Fc-область IgG4, и может быть негликозилированной областью, но этим не ограничивается. Кроме того, F может представлять собой Fc-область иммуноглобулина, полученную путем замены одной или нескольких аминокислот в Fc-области IgG4 человека, но этим не ограничивается.

В слитом с ферментом белке химической формулы 1 F может представлять собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина, но этим не ограничивается.

Конкретные примеры F в химической формуле 1 могут включать мономер, который содержит замену аминокислоты в положении 2 на пролин; замену аминокислоты в положении 71 на глутамин; или замену аминокислоты в положении 2 на пролин и замену аминокислоты в положении 71 на глутамин в Fc-области иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или мономер SEQ ID NO: 9, но этим не ограничиваются.

Fc-область иммуноглобулина представляет собой вещество, используемое в качестве носителя при получении лекарственных средств, и в последнее время активно проводятся исследования слитых белков, в которых используют Fc-область иммуноглобулина, чтобы стабилизировать белки и предотвратить их удаление из почек. Иммуноглобулины являются основными составляющими крови, и существует пять различных типов, таких как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Наиболее часто используемым типом в исследованиях слитых белков является IgG, и его подразделяют на четыре подтипа IgG1-4. Присутствие слитых белков, полученных с использованием Fc-области иммуноглобулина, может увеличивать размер белков, предотвращая тем самым их удаление из почек, и также может способствовать связыванию с неонатальными Fc-рецепторами (FcRn), участвуя тем самым в увеличении периода полувыведения из крови посредством эндоцитоза и рециркуляции в клетках.

В настоящем изобретении Fc-область относится к природной последовательности, полученной в результате расщепления папаином иммуноглобулина, а также его производного, например, к вариантам, имеющим последовательности, отличающиеся от природной формы делецией, вставкой, неконсервативной или консервативной заменой одного или нескольких аминокислотных остатков в природной последовательности либо их комбинацией, при условии, что производные, заместители и варианты сохраняют способность связываться с FcRn. В настоящем изобретении F может представлять собой область иммуноглобулина человека, но этим не ограничивается. В слитом с ферментом белке химической формулы

1 по настоящему изобретению F представляет собой мономерную Fc-область иммуноглобулина, содержащую одну полипептидную цепь, при этом на основании этой полипептидной цепи образуется димер из двух полипептидных цепей посредством дисульфидной связи, и такой слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может иметь структуру, содержащую димерную Fc-область иммуноглобулина. В частности, слитый с ферментом белок может иметь структуру, в которой цепи присоединены только через атом азота одной из этих двух цепей, но этим не ограничивается. Связь через атом азота может представлять собой связь, образующуюся в результате восстановительного аминирования по эpsilon-аминогруппе лизина или N-концевой аминогруппе.

Реакция восстановительного аминирования означает реакцию, при которой группа амина или аминогруппа реагента взаимодействует с альдегидом (т.е. функциональной группой, способной к участию в восстановительном аминировании) другого реагента с получением амина, а затем в результате реакции восстановления связи образуется амин, и реакция восстановительного аминирования представляет собой используемую в органическом синтезе реакцию, широко известную в данной области техники.

В одном конкретном примере, Fc-области иммуноглобулинов могут быть присоединены одна к другой через атом азота N-концевого пролина, но этим не ограничиваются.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой протяженную Fc-область, содержащую всю константную область 1 тяжелой цепи (CH1) или ее часть и/или константную область 1 легкой цепи (CL1), не включающую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии, что такая Fc-область иммуноглобулина оказывает эффект по существу эквивалентный или улучшенный по сравнению с нативным типом. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой удалена довольно протяженная часть аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3.

Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой 1) CH1-домен, CH2-домен, CH3-домен и CH4-домен, 2) CH1-домен и CH2-домен, 3) CH1-домен и CH3-домен, 4) CH2-домен и CH3-домен и 5) комбинацию, состоящую из одного домена либо двух или более доменов, выбранного(ых) из CH1-домена, CH2-

домена, СН3-домена и СН4-домена, и шарнирной области (или части шарнирной области) иммуноглобулина, но этим не ограничивается. Более конкретно, Fc-область иммуноглобулина может состоять из шарнирной области, СН2-домена и СН3-домена, но этим не ограничивается.

В настоящем изобретении F (Fc-область иммуноглобулина) в химической формуле 1 может быть в форме мономера, но этим не ограничивается. В частности, Fc-область иммуноглобулина может включать одноцепочечный иммуноглобулин, состоящий из доменов такого же происхождения, но этим не ограничивается.

В настоящем изобретении Fc-область иммуноглобулина, обозначенная как F в химической формуле 1, может быть в форме мономера и может быть экспрессирована с использованием слитой через пептидный линкер конструкции с мономерным терапевтическим ферментом. Поскольку мономерные Fc-области иммуноглобулинов образуют димер, то терапевтический фермент, слитый с Fc-областью иммуноглобулина, также может образовывать димер посредством нековалентной связи, но этим не ограничивается.

Такая Fc-область иммуноглобулина может содержать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, и благодаря наличию шарнирной области мономерные Fc-области иммуноглобулинов могут образовывать димер, но этим не ограничиваются.

В настоящем изобретении Fc-область иммуноглобулина может содержать конкретную последовательность шарнирной области на N-конце.

Использованный в данном описании термин «последовательность шарнирной области» относится к участку, расположенному в тяжелой цепи и способствующему образованию димера Fc-областей иммуноглобулинов через внутреннюю дисульфидную связь.

В качестве одного примера, последовательность шарнирной области может представлять собой последовательность, в которой выполнены делетирование или модификация части последовательности шарнирной области, имеющей приведенную ниже аминокислотную последовательность:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 14).

Конкретно, шарнирная область может представлять область, имеющую изменение, при этом часть шарнирной области делетирована, чтобы включать только один остаток цистеина (Cys); или может представлять область, в которой остаток серина

(Ser), участвующий в обмене цепями, заменен на остаток пролина (Pro), и более конкретно, область, в которой 2-ой остаток серина в последовательности шарнирной области заменен на остаток пролина, но этим не ограничивается.

В качестве одного примера, шарнирная область по настоящему изобретению может содержать или может (по существу) состоять из последовательности Pro-Pro-Cys-Pro (SEQ ID NO: 15), и Fc-область иммуноглобулина может содержать последовательность шарнирной области SEQ ID NO: 15, но этим не ограничивается.

Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать в себя нативную шарнирную область или модифицированную шарнирную область для образования димера посредством ковалентной связи в составе одной молекулы Fc-области иммуноглобулина, но этим не ограничивается.

Fc-область иммуноглобулина, используемая в качестве носителя для лекарственного средства, имеет недостаток, заключающийся в том, что она может вызывать непреднамеренный иммунный ответ, например, в результате наличия таких эффекторных функций, как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Эти функции осуществляются посредством связывания Fc-области иммуноглобулина с Fc-рецептором или компонентом системы комплемента либо посредством гликозилирования Fc-области. К тому же высока вероятность того, что *in vivo* может иметь место нестабильность самой Fc-области.

Авторами настоящего изобретения были предприняты усилия для решения вышеупомянутой проблемы путем внесения замен в последовательность шарнирной области в Fc-области иммуноглобулина. Конкретно, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в последовательность возможного гликозилирования которой внесена замена с целью регулирования гликозилирования или замена внесена в последовательность, участвующую в обмене цепями, либо возможно соответствие обоим случаям. Более конкретно, Fc-область иммуноглобулина в слитом с ферментом белке по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой никакого обмена цепями не происходит.

Конкретно, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой 2-ая аминокислота и/или 71-ая аминокислота в Fc-области иммуноглобулина SEQ ID NO: 8 заменены на другую аминокислоту для предотвращения обмена цепями и N-гликозилирования. Более конкретно, Fc-область

иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой: 1) область, в которой 2-ая аминокислота (серин) заменена на пролин, 2) область, в которой 71-ая аминокислота (аспарагин) заменена на глутамин, или 3) область, в которой 2-ая аминокислота заменена на пролин, а 71-ая аминокислота заменена на глутамин в Fc-области иммуноглобулина SEQ ID NO: 8, и, в частности, может быть Fc-областью иммуноглобулина, представленной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, но этим не ограничивается. Помимо описанных выше вариантов Fc-область иммуноглобулина может включать соответствующий вариант в качестве носителя лекарственного средства для повышения стабильности терапевтического фермента.

В частности, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой область, в которой шарнирная область Fc-области иммуноглобулина IgG4 заменена на шарнирную область IgG1, но этим не ограничивается.

В одном из воплощений настоящего изобретения 2-ая аминокислота в Fc-области иммуноглобулина заменена на пролин, а 71-ая аминокислота Fc-области иммуноглобулина заменена на глутамин, тем самым снижается вероятность осуществления обмена цепями и N-гликозилирования (пример 1).

Использованный в данном описании термин «обмен цепями» относится к проблеме, заключающейся в том, что, если в качестве носителя для структуры слитого белка используют Fc-область IgG4, то эта Fc-область IgG4 образует гибрид с IgG4, присутствующим *in vivo*, или присутствует в виде мономера и изменяет исходную структуру с приобретением структуры с низкой терапевтической активностью, и ранее сообщалось, что имеются значительные трудности, когда структура слитого белка, в которой имеет место слияние с белком, используется для терапевтических целей (van der Neut Kolfshoten, et al., Science, 317: 1554-1557, 2007).

Кроме того, в другом конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению содержит не только нативные аминокислотные последовательности, но также аналоги этих последовательностей. Термин «аналог аминокислотной последовательности» означает, что изменение, выбранное из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, произошло в одном или нескольких аминокислотных остатках нативной аминокислотной последовательности.

Например, в качестве сайтов, подходящих для внесения изменений могут быть использованы аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331 в Fc-области IgG, которые, как известно, важны для связывания.

Кроме этого, могут существовать различные типы аналогов, например, аналог, в котором удален сайт, способный к образованию дисульфидной связи, аналог, в котором удалены некоторые аминокислотные остатки на N-конце нативной Fc-области, аналог, в котором к N-концу нативной Fc-области присоединен остаток метионина, и так далее. Кроме того, для устранения эффекторной функции могут быть удалены комплементсвязывающие сайты, например, сайты связывания C1q (первого компонента системы комплемента) или сайты, связанные с антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC). Методы получения таких аналогов для последовательности Fc-области иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных патентных заявок №№ WO 97/34631, WO 96/32478 и так далее.

В данной области техники хорошо известны аминокислотные замены в молекулах белков и пептидов, которые обычно не изменяют общей активности молекул (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами аминокислотных остатков являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly. В некоторых случаях аминокислоты могут быть модифицированы путем фосфорилирования, сульфатирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и так далее.

Кроме того, описанные выше аналоги Fc-области могут представлять собой аналоги, которые демонстрируют биологическую активность, эквивалентную активности Fc-области иммуноглобулина по настоящему изобретению, но которые имеют улучшенную стабильность структуры Fc-области в отношении нагревания, pH или так далее.

Кроме того, такая Fc-область может быть получена из нативных форм, выделенных из людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и т.д., или может представлять собой их рекомбинантные формы или аналоги, полученные из трансфицированных клеток животных или из микроорганизмов. В данном описании способом получения Fc-области из нативной формы может быть способ выделения целых молекул иммуноглобулина из организмов человека или животного и затем обработки этих молекул протеазой. В результате

обработки папаином происходит расщепление на Fab- и Fc-области, а в результате обработки пепсином происходит расщепление на фрагменты pF'c («р» означает «пепсин») и F(ab)₂. Эти фрагменты могут быть подвергнуты эксклюзионной хроматографии с целью выделения Fc или pF'c. В более конкретном воплощении Fc-область может представлять собой Fc-область рекомбинантного иммуноглобулина, при этом происходящую из иммуноглобулина человека Fc-область получают с использованием микроорганизма.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть в форме, содержащей нативные гликаны, гликаны увеличенного размера по сравнению с их нативным типом, гликаны уменьшенного размера по сравнению с их нативным типом, или быть в дегликозилированной или негликозилированной форме. Увеличение, уменьшение размера или удаление гликанов Fc-области иммуноглобулина может быть достигнуто общеизвестными методами, такими как химический метод, ферментативный метод и метод геной инженерии с использованием микроорганизмов. В данном описании Fc-область иммуноглобулина, полученная путем удаления гликанов из Fc-области, демонстрирует значительное уменьшение аффинности связывания с компонентом системы комплемента C1q и снижение или утрату антителозависимой цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и поэтому нежелательные иммунные ответы не будут индуцироваться *in vivo*. В этом отношении, Fc-область иммуноглобулина в виде дегликозилированной или негликозилированной Fc-области иммуноглобулина может представлять собой более подходящую форму, соответствующую первоначальной цели настоящего изобретения, в качестве носителя для лекарственного средства.

Использованный в данном описании термин «дегликозилирование» относится к ферментативному удалению гликана из Fc-области, а термин «агликозилирование» относится к получению негликозилированной Fc-области, продуцируемой в прокариотах, в более конкретном воплощении, в *E. coli*.

При этом Fc-область иммуноглобулина может происходить из иммуноглобулина людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы или морские свинки и т.д., и в более конкретном воплощении она может происходить из иммуноглобулина людей.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область, происходящую из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM либо их комбинации или гибрида. В более конкретном воплощении она может происходить из IgG или IgM, которые являются

одними из самых распространенных белков в крови человека, и в еще более конкретном воплощении она может происходить из IgG, что, как известно, увеличивает периоды полувыведения лигандсвязывающих белков. В более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область IgG4, и в еще более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина может представлять собой негликозилированную Fc-область, происходящую из человеческого IgG4, и в наиболее конкретном воплощении аминокислотная последовательность Fc-области иммуноглобулина имеет SEQ ID NO: 9, а кодирующая ее полинуклеотидная последовательность может иметь SEQ ID NO: 7, но этим не ограничивается.

Использованный в данном описании термин «комбинация» означает, что полипептиды, представляющие собой одноцепочечные Fc-области иммуноглобулинов одного происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Другими словами, димер или мультимер может быть получен с использованием двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов Fc-области Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и IgE.

Кроме того, терапевтический фермент или слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может быть в такой форме, когда N-конец и/или C-конец не будет модифицирован, однако, для защиты терапевтических ферментов от действия протеаз *in vivo* и для повышения стабильности в объеме терапевтических ферментов или слитых с ферментом белков по настоящему изобретению также включены такие варианты, когда их N-конец и/или C-конец будут химически модифицированы или защищены группами органических соединений либо когда конец данного пептида будет модифицирован путем присоединения аминокислоты, и так далее. В случае, когда C-конец не модифицирован, этот конец терапевтического фермента или слитого с ферментом белка по настоящему изобретению может иметь карбоксильную группу, но конкретно этим не ограничивается.

В частности, поскольку N-конец и C-конец химически синтезированных белков несут электрический заряд, то N-конец может быть ацетилирован и/или C-конец может быть амидирован для устранения этих зарядов, но конкретно этим не ограничиваются.

Использованный в данном описании термин «N-конец» относится к амино-концу белка или полипептида и может включать в себя самый концевой аминокислотный остаток амино-конца или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 либо более аминокислот, начиная

от самого концевго остатка. Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать в себя последовательность шарнирной области на N-конце, но этим не ограничивается.

Если в описании настоящего изобретения не указано иное, то технологии, описанные в настоящем изобретении в разделе Подробное описание или в формуле изобретения в отношении «фермента» или «слитого белка» по настоящему изобретению, будут применимы не только к соответствующему ферменту или слитому белку, но также в том объеме, который включает все соли соответствующего фермента или слитого белка (например, фармацевтически приемлемую соль слитого белка) или их сольват. Соответственно, хотя в описании он описан просто как «фермент» или «слитый белок», соответствующее описание будет точно также применимо к конкретной соли, конкретному сольвату и конкретному сольвату конкретной соли. Такие солевые формы, могут быть в форме, например, в которой используют любую фармацевтически приемлемую соль, но вид соли конкретно не ограничивается. Например, такие солевые формы могут представлять собой формы, которые безопасны и эффективны для индивидов, например, млекопитающих, но конкретно этим не ограничиваются.

Использованный в данном описании термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, которое может быть с эффективностью использовано для предполагаемого применения в рамках фармако-медицинского заключения без вызывания чрезмерных токсичности, раздражения или аллергических реакций.

Использованный в данном описании термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, происходящей из фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих кислот могут включать соляную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-*n*-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и так далее. Примеры солей, происходящих из подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов, таких как натрий, калий и т.д., щелочноземельных металлов, таких как магний, аммония и так далее.

Кроме того, использованный в данном описании термин «сольват» относится к комплексу, образованному между молекулой растворителя и слитым с ферментом белком по настоящему изобретению или его солью.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может быть получен способом, известным в данной области техники.

В одном из воплощений получения слитого с ферментом белка по настоящему изобретению готовили рекомбинантный вектор, в котором альфа-галактозидаза в качестве терапевтического фермента может быть экспрессирована в форме, слитой со структурой пептидный линкер-Fc-область иммуноглобулина, и затем экспрессирована в клеточной линии, но данный способ не ограничивается этим, и слитый с ферментом белок может быть получен другими известными способами, отличающимися от способа, описанного в данной заявке. Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, но этим не ограничивается.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может увеличивать время полужизни терапевтического фермента путем повышения стабильности терапевтического фермента *in vivo* при сохранении его активности благодаря слиянию терапевтического фермента с Fc-областью иммуноглобулина. В частности, терапевтический фермент, слитый с модифицированной Fc-областью иммуноглобулина, характеризуется сниженным обменом цепями и гликозилированием и, таким образом, может обладать более низкой аффинностью связывания с рецепторами лизосом по сравнению с терапевтическим ферментом, не слитым с Fc, имея тем самым большую продолжительность действия, и это подтверждает, что такой терапевтический фермент эффективен для лечения целевых заболеваний.

Приведенные выше описания также могут быть применимы к другим конкретным воплощениям или аспектам настоящего изобретения, но ими не ограничиваются.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок в фармацевтически эффективном количестве и возможно дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент. Композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что продолжительность пребывания и стабильность терапевтического фермента *in vivo* повышаются.

Слитый с ферментом, в том числе с альфа-галактозидазой, белок по настоящему изобретению может снижать уровень лизо-Gb3, который накапливается в почечной ткани вследствие дефекта альфа-галактозидазы, тем самым его можно использовать для лечения заболеваний (например, нейропатии), вызываемых накоплением лизо-Gb3.

Лизо-Gb3 (глоботриаозилсфингозин) представляет собой деацилированную форму Gb3 (глоботриаозилцерамида), и известно, что лизо-Gb3 или Gb3 играют непосредственную роль в работе периферических ноцицептивных нейронов и что терапевтический эффект в отношении нейропатии может быть достигнут путем снижения их уровня.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать слитый с ферментом белок с целью проявления профилактического или терапевтического действия в отношении нейропатии.

Использованный в данном описании термин «нейропатия» относится к заболеванию, при котором в нервной системе происходит функциональное нарушение или патологическое изменение. В зависимости от причины нейропатию можно классифицировать как мышьяковую нейропатию, диабетическую нейропатию, ишемическую нейропатию или травматическую нейропатию. Кроме того, нейропатия может быть вызвана наследственными заболеваниями, например, Шарко-Мари-Тута (СМТ), семейным амилоидозом, болезнью Фабри, метахроматической лейкодистрофией и так далее. В настоящем изобретении нейропатия может представлять собой нейропатию, вызванную или связанную с болезнью Фабри.

Известно, что накопление лизо-Gb3 у пациентов с болезнью Фабри происходит без осуществления расщепления вследствие дефектов альфа-галактозидазы, и накопленный лизо-Gb3 поражает нервную систему, приводя в результате к множеству различных симптомов периферической нейропатии.

Поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно применять в случае ферментозаместительной терапии, то он может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри вследствие дефектов альфа-галактозидазы, или нейропатии, которая развивается вследствие болезни Фабри и связана с болезнью Фабри.

С учетом целей настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, может проявлять профилактическое или терапевтическое

действие в отношении полинейропатии или нейропатии мелких волокон, но этим не ограничивается. Кроме того, нейропатия по настоящему изобретению может быть сопровождаться нейропатической болью, но этим не ограничивается.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению или содержащая его фармацевтическая композиция может оказывать защитное действие в отношении периферических сенсорных нервов и также может подавлять вакуолизацию клеток спинномозгового ганглия (DRG), но этим не ограничивается.

Известно, что структурные и функциональные модификации (например, вакуолизация) клеток спинномозгового ганглия вызывают нейропатию, и слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может предотвращать и ослаблять сенсорные и сенсорно-двигательные нарушения путем подавления таких модификаций и защиты нервных клеток.

Другими словами, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению и содержащая его композиция могут проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, путем защиты функций периферических сенсорных нервов и путем подавления модификаций клеток, которые вызывают нейропатию.

Использованный в данном описании термин «предупреждение» относится ко всем видам действий, связанным с подавлением или задержкой возникновения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, путем введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции, а термин «лечение» относится ко всем видам действий, связанным с ослаблением или благотворным изменением симптомов нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, путем введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции.

Использованный в данном описании термин «введение» относится к введению конкретного вещества пациенту любым подходящим способом, и путь введения композиции может представлять собой, но конкретно этим не ограничивается, любой общепризнанный путь, которым можно осуществлять доставку композиции в мишень *in vivo*, например, внутрибрюшинное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, интрадермальное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, внутрилегочное введение, интаректальное введение и так далее. Однако, поскольку пептиды расщепляются после перорального введения, то активные ингредиенты композиции для перорального введения

предпочтительно покрывают оболочками или на их основе готовят препараты с защитой от расщепления в желудке, и, в частности, их можно вводить в инъекционной форме. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с использованием любого устройства, с помощью которого можно переносить активные ингредиенты в клетку-мишень.

Общую эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в виде разовой дозы или можно вводить в течение длительного периода времени в виде многократных доз согласно протоколу дробного лечения. Содержание активного ингредиента в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. Конкретно, предпочтительная общая суточная доза слитого белка по настоящему изобретению может составлять примерно от 0,0001 мг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Тем не менее, эффективную дозу слитого белка определяют, учитывая различные факторы, в том числе возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, тяжесть заболевания, рацион питания пациента и скорость экскреции и т.д. помимо пути введения фармацевтической композиции и частоты лечения ею. Ввиду этого, специалисты в данной области техники могут легко определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, в частности, не ограничивается такой композицией, таким путем и способом введения при условии, что она оказывает действия в соответствии с настоящим изобретением.

Фактическая доза слитого с ферментом белка по настоящему изобретению определяется на основании типов терапевтического фермента, используемого в качестве активного ингредиента, вместе с различными факторами, такими как подвергаемое лечению заболевание, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента, тяжесть заболевания и так далее. Поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению обладает превосходными качествами с точки зрения продолжительности пребывания в крови и активности *in vivo*, то дозу, число введений и частоту введения фармацевтической композиции, содержащей слитый с ферментом белок по настоящему изобретению, можно значительно уменьшить.

В частности, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению обладает повышенной продолжительностью действия благодаря высокой стабильности и может сохранять ферментативную активность в течение длительного периода времени по сравнению с ферментами, которые не находятся в форме слитых белков, и поэтому он

может проявлять превосходные фармакологические эффекты путем непрерывного воздействия на ткани-мишени для осуществления лечения.

В одном типичном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что при введении слитого с ферментом белка мышам с нокаутом гена альфа-галактозидазы в режиме со сниженной частотой введения терапевтический эффект оказывался эквивалентным или превосходил таковой у фермента, не являющегося слитым белком. Соответственно, частота введения слитого с ферментом белка индивиду, нуждающемуся в этом, может быть снижена по сравнению с таковой для фермента, не являющегося слитым белком, но этим не ограничивается.

В отличие от слитого с ферментом белка по настоящему изобретению фермент, который не находится в форме слитого белка, может относиться к самому ферменту, с которым носитель (например, Fc-область иммуноглобулина) не связан. Его примеры могут включать Fabrazyme® (агалзидазу-бета), но этим не ограничиваются.

В частности, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно вводить в количестве от примерно 0,0001 мкг до примерно 500 мг на 1 кг массы тела пациента, конкретно, от примерно 0,001 мг до примерно 100 мг, конкретно от 0,01 мг до 500 мг и более конкретно, примерно от 0,1 мг до 10 мг на 1 кг массы тела пациента один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц, и даже если интервал между введениями возрастает, фармакологическая активность слитого с ферментом белка в организме сохраняется, и следовательно, это будет более удобно для пациента.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать в себя фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель (эксципиент) или разбавитель. Такими носителями могут быть носители не природного происхождения.

Использованный в данном описании термин «фармацевтически приемлемый» означает количество, достаточное для проявления терапевтического эффекта без вызывания побочных эффектов, и специалист в данной области техники легко может определить его с учетом факторов, хорошо известных в области медицины, таких как тип заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол и восприимчивость пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственные средства, которые применяют в смеси или вводят одновременно, и так далее.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать для перорального введения – связующее вещество, глидант, разрыхлитель, разбавитель, солюбилизующий агент, диспергирующее вещество, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и т.д.; для инъекций – буферный агент, консервант, анальгезирующий агент, солюбилизующий агент, поддерживающий изотоничность агент, стабилизирующий агент и т.д., которые могут быть использованы в смеси; и для местного введения – основу, разбавитель, смазывающее вещество, консервант и так далее.

Препарат на основе фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть различным образом приготовлен путем объединения с фармацевтически приемлемым носителем, описанным выше. Например, в случае перорального введения фармацевтическая композиция может быть приготовлена в таблетках, лепешках, капсулах, эликсирах, суспензиях, сиропах, облатках и так далее. В случае инъекций фармацевтическая композиция может быть приготовлена в однодозовых ампулах или многодозовых контейнерах. Помимо этого, фармацевтическая композиция также может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, композиций с длительным высвобождением и так далее.

При этом примеры носителей, наполнителей и разбавителей, подходящих для композиций, могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и так далее. Помимо этого, композиция может дополнительно включать в себя наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, смачивающий агент, корригент, консервант и так далее.

Кроме того, слитый с ферментом белок можно использовать путем смешивания с различными носителями, одобренными к применению в качестве фармацевтически приемлемых, такими как физиологический раствор или органические растворители. Чтобы повысить стабильность или всасываемость, в качестве фармацевтически приемлемых носителей можно использовать углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, и антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы.

Фармацевтическая композиция может содержать, но не ограничивается этим, вышеупомянутые ингредиенты (активные ингредиенты) в количестве от 0,01% до 99% (масс./об.).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом способ включает стадию введения индивиду слитого с ферментом белка или содержащей его композиции.

Слитый с ферментом белок, композиция, нейропатия, предупреждение и лечение являются такими же, как описано выше.

Поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может содержать терапевтический фермент, с использованием которого можно предотвращать или лечить нейропатию, вызванную или связанную с болезнью Фабри, то нейропатию, вызванную или связанную с болезнью Фабри, можно предотвращать или лечить у индивида с подозрением на наличие данного заболевания путем введения слитого с ферментом белка или фармацевтической композиции, содержащей слитый с ферментом белок.

Использованный в данном описании термин «индивид» относится к индивиду с подозрением на наличие нейропатии, а термин «индивид с подозрением на наличие нейропатии» относится к млекопитающим, включая мышей, сельскохозяйственных животных и т.д., в том числе людей, которые уже имеют соответствующее заболевание или у которых может развиться заболевание, тем не менее индивид включает всех индивидов без ограничения, при условии, что они могут быть подвергнуты лечению слитым с ферментом белком по настоящему изобретению или содержащей его композицией. В частности, индивидом может быть индивид, у которого развилась болезнь Фабри или который имеет высокий риск болезни Фабри, однако в объем настоящего изобретения включен любой индивид без ограничения, при условии, что у данного индивида развилась или может развиться нейропатия, ассоциированная с болезнью Фабри.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей слитый с ферментом белок. Соответствующая общая суточная доза может быть определена практикующим врачом в рамках корректного медицинского заключения, и композицию можно вводить один или несколько раз в виде разделенных доз. Однако, учетом целей

настоящего изобретения предпочтительно, чтобы конкретная терапевтически эффективная доза для любого конкретного пациента применялась по-разному в зависимости от различных факторов, включая тип и степень ответных реакций, которые должны быть достигнуты, конкретные композиции, в том числе независимо от того, будут ли в них периодически использованы другие агенты, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания пациента, продолжительность введения, путь введения, скорость экскреции композиции, продолжительность лечения, наличие других лекарственных средств, использованных в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Путь введения, вводимая доза и применимость являются такими же, как описано выше.

При этом способ предупреждения или лечения нейропатии может представлять собой комбинированную терапию, которая дополнительно включает введение одного или более соединений или веществ, оказывающих терапевтическое действие в отношении нейропатии, но данный способ этим не ограничивается.

Следует понимать, что использованный в данном описании термин «комбинация» относится к одновременному, раздельному или последовательному введению. Если введение осуществляют последовательно или раздельно, то интервалом, разрешенным для введения второго ингредиента, должен быть интервал, благодаря которому не утрачиваются полезные эффекты комбинации.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри.

Слитый с ферментом белок, композиция, нейропатия, предупреждение и лечение являются такими же, как описано выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для приготовления профилактического или терапевтического агента (или фармацевтической композиции) в случае нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри.

Слитый с ферментом белок, композиция, нейропатия, предупреждение и лечение являются такими же, как описано выше.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на типичные воплощения. Однако эти типичные воплощения приведены только в иллюстративных целях, и не подразумевается, что объем настоящего изобретения ограничен этими типичными воплощениями.

Пример 1. Получение слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc)

Для получения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (далее этот термин используется взаимозаменяемо с термином «слитый с ферментом белок»), содержащего терапевтический фермент в форме антипараллельного димера, авторы настоящего изобретения выполнили слияние нативной альфа-галактозидазы, линкера (SEQ ID NO: 10) и Fc-области иммуноглобулина (SEQ ID NO: 7) на генетическом уровне и встраивание этого продукта в экспрессирующий вектор.

Чтобы удалить сайты обмена цепями и N-гликозилирования в Fc-областях в последовательности сконструированного слитого с ферментом белка, использовали метод сайт-специфического мутагенеза с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Подробно, серин, который является 2-ой аминокислотой в Fc-области (SEQ ID NO: 8), участвующий в обмене цепями, заменяли на пролин, используя праймеры с SEQ ID NO: 1 и 2, а аспарагин, который является 71-ой аминокислотой в Fc-области, участвующий в N-гликозилировании, заменяли на глутамин, используя праймеры с SEQ ID NO: 3 и 4.

Таблица 1

Праймер для мутагенеза

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO.
Fc(S2P)_F	5' - CTGCGGGTGGCGGATCGCCACCAATGCCAGCACCTGAGTTCCT-3'	1
Fc(S2P)_R	5' - AGGAACTCAGGTGCTGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3'	2
Fc(N71Q)_F	5' - AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAG-3'	3
Fc(N71Q)_R	5' - CTGACCACACGGTAAGTGCCTTTGGAACTGCTCCTCCCGCGGCT-3'	4

Полинуклеотид, кодирующий синтезированный слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, встраивали в вектор XOGC, представляющий собой экспрессирующий вектор, используя ферменты рестрикции. Ферментами рестрикции, которые не катализируют расщепления внутри участков кодирования альфа-галактозидазы и Fc-

области иммуноглобулина, являются как BamHI, так и XhoI. Выделенный с применением указанных выше ферментов рестрикции фрагмент альфа-галактозидаза-Fc встраивали в вектор XOGC, подвергнутый расщеплению этими же ферментами рестрикции, тем самым завершая получение вектора, способного экспрессировать слитый белок альфа-галактозидаза-Fc. Альфа-галактозидаза образует антипараллельный димер, когда Fc-области иммуноглобулина образуют димер.

Последовательности ДНК и слитого белка альфа-галактозидаза-Fc приведены ниже в Таблице 2. В показанной ниже Таблице 2 подчеркнутые части белковой последовательности белка представляют сигнальную последовательность, выделенные жирным шрифтом части представляют замененные аминокислоты, а выделенные курсивом части представляют линкеры.

Таблица 2

Название	Последовательность	SEQ ID NO.
Альфа-галактозидаза-Fc	ДНК <u>ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTGG</u> <u>CTTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACCTGGACA</u> ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAAGC TGGAAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTAOGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTGAT GGTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTA TATGTGGCCC TTTCAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTGGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACCTAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACCT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT	12

		<p>GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCAGTGTG TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC <i>GGCGGAGGTT</i> <i>CAGGTGGTGG TGGCTCTGCC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA</i> <i>GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCA CCAATGCCAG CACCTGAGTT</i> CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCCAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAG TGA</p>	
	Белок	<p><u>MQLRNPELHL GCALALRELA LVSWDIPGAR ALDNGLARTP TMGVLHVERF</u> MCNLDCQEEP DSCISEKLFM EMAELNVSEG WKDAGYEYLC IDDCVMAPQR DSEGRLOADP QRFPHGIRQL ANYVHSGKGL LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFD DWGVLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY</p>	13

		SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSWKS IK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPOAKAL LQDKDVI AIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTI A VA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGG	
--	--	---	--

Полученный в этом примере вектор, экспрессирующий слитый с ферментом белок, получил название «вектор альфа-галактозидаза-Fc».

Пример 2. Действие слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) в отношении ослабления нейропатии *in vivo*

Чтобы подтвердить действие слитого с ферментом белка по настоящему изобретению в отношении сенсорных и сенсорно-двигательных нарушений периферической нервной системы, включая боль и утрату температурной чувствительности, обусловленных накоплением лизо-Gb3, проводили приведенный ниже эксперимент.

Для оценки терапевтического эффекта в отношении нейропатии после введения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) мышам с нокаутом (КО; от knock-out) гена альфа-галактозидазы (α -Gal A КО, Jackson Laboratory, инвентарный номер 003535) готовили 5 групп мышей. Первая группа включала мышей дикого типа ($n = 6$), которым вводили разбавитель для слитого белка альфа-галактозидаза-Fc. Вторую часть из оставшихся групп составляют экспериментальные группы мышей с нокаутом гена альфа-галактозидазы ($n = 7$); группа 2: с введением разбавителя для слитого белка альфа-галактозидаза-Fc; группа 3: с введением агалтидазы-бета (1,0 мг/кг; один раз каждые 2 недели, внутривенно); группа 4: с введением слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (1,0 мг/кг; один раз каждые 2 недели, подкожно); и группа 5: с

введением слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (2,0 мг/кг; один раз каждые 4 недели, подкожно).

Чтобы оценить чувствительность периферической нервной системы, определяли степень улучшения температурной чувствительности путем проведения теста с горячей пластинкой на мышах перед введением, через 12 недель после введения и через 20 недель после введения, соответственно. Этим животным помещали в стеклянный цилиндр на горячую пластинку, температуру которой подводили до 55°C, наблюдали за поведением мышей и измеряли время реакции (время задержки) до момента отрыва задних лап от горячей пластинки.

В результате мыши с нокаутом гена альфа-галактозидазы демонстрировали гораздо более высокое пороговое значение задержки в тесте с горячей пластинкой по сравнению с мышами дикого типа. После многократного введения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc мыши демонстрировали более низкое пороговое значение задержки по сравнению с контрольной группой, получавшей разбавитель, и группой, которой вводили агалтидазу-бета. В частности, было подтверждено, что пороговое значение задержки у мышей после многократного введения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc существенно снижалось до уровня статистически сравнимого с таковым у мышей дикого типа (ФИГ. 1).

Помимо этого, через 20 недель спинномозговой ганглий (DRG), там, где тела нервных клеток сенсорных нейронов распространяются от поясничного отдела позвоночника, окрашивали толуидиновым синим и анализировали гистологическим методом, чтобы оценить на клеточном уровне действие слитого белка альфа-галактозидаза-Fc в отношении ослабления нейропатии.

Чтобы сравнить статистическую значимость между получавшей разбавитель группой (контрольной группой) и экспериментальными группами, проводили статистический анализ, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) (* ~ *** $p < 0,05 \sim 0,001$) или непарный t-критерий ($\dagger\dagger p < 0,01$).

В результате при гистологическом анализе на клеточном уровне было подтверждено, что у мышей с нокаутом гена альфа-галактозидазы наблюдалось превосходящее увеличение числа вакуолизованных нейронов в спинномозговой ганглии по сравнению с мышами дикого типа, что согласуется с результатами теста с горячей пластинкой (ФИГ. 1). Было подтверждено, что эти клеточные поражения подавлялись со статистически значимым уровнем в группе мышей, которым вводили

слитый белок альфа-галактозидаза-Fc в течение 20 недель. Однако, в группе, которой вводили агалтидазу-бета, значительного улучшения по сравнению с группой, получавшей разбавитель, показано не было (ФИГ. 2).

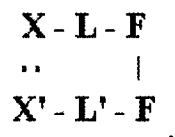
Эти экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что слитый белок альфа-галактозидаза-Fc обладает улучшенной стабильностью в лизосомах и на основании этого он может проявлять защитное или терапевтическое действие в отношении нейропатии путем защиты периферических сенсорных нервов и подавления деформации нервных клеток.

На основании приведенного выше описания специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение может быть реализовано в другой конкретной форме без изменения его технической сущности или существенных признаков. В связи с этим следует понимать, что вышеупомянутое воплощение является не ограничивающим, а иллюстративным во всех аспектах. Объем данного изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим ей описанием, и поэтому подразумевается, что все изменения и модификации, попадающие в пределы и границы формулы изобретения, или в эквиваленты таких пределов и границ, охватываются формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нейропатии, вызванной или связанной с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция, содержит слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1



где X и X' каждый представляет собой альфа-галактозидазу;

L и L' представляют собой линкеры, каждый из которых независимо является линкером одного и того же или другого вида;

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фермент представляет собой антипараллельный димер, образованный X и X'.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина является негликозилированной.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

5. Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина имеет замену аминокислоты в положении 2 на пролин; замену аминокислоты в положении 71 на глутамин; или замену аминокислоты в положении 2 на пролин и замену аминокислоты в положении 71 на глутамин в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

6. Фармацевтическая композиция по п. 1, где линкер представляет собой пептидный линкер, состоящий из аминокислот числом от 1 до 100 аминокислот.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности [GS]_x, [GGGS]_x или [GGGS]_x, где x равно натуральному числу от 1 до 20.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, где пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

9. Фармацевтическая композиция по п. 1, где нейропатия представляет собой полинейропатию или нейропатию мелких волокон.

10. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармацевтическая композиция оказывает защитное действие в отношении периферических сенсорных нервов.

11. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармацевтическая композиция подавляет вакуолизацию клеток спинномозгового ганглия (DRG).

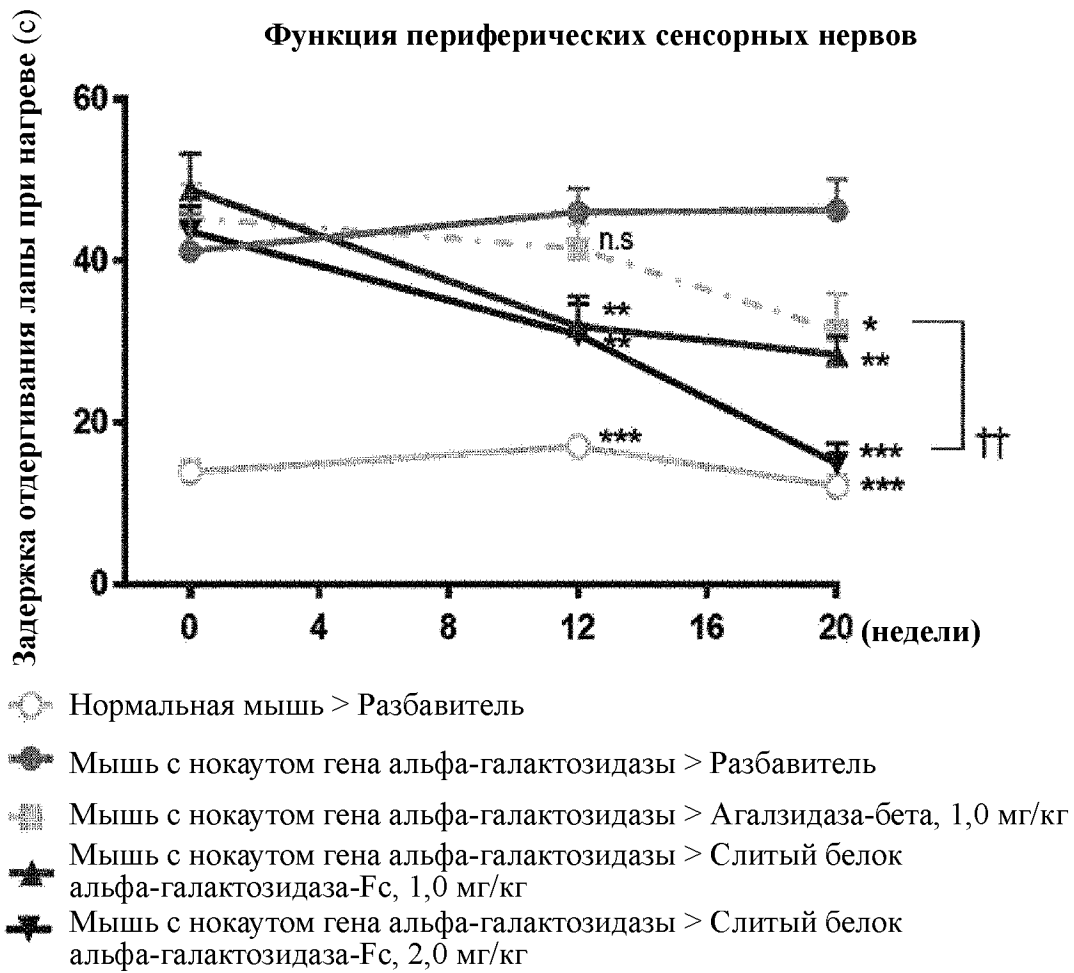
12. Фармацевтическая композиция по п. 1, где частота введения слитого с ферментом белка индивиду, нуждающемуся в этом, снижена по сравнению с таковой для фермента, не являющегося слитым с белком.

13. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармацевтическую композицию вводят индивиду один раз каждые две недели или один раз в месяц.

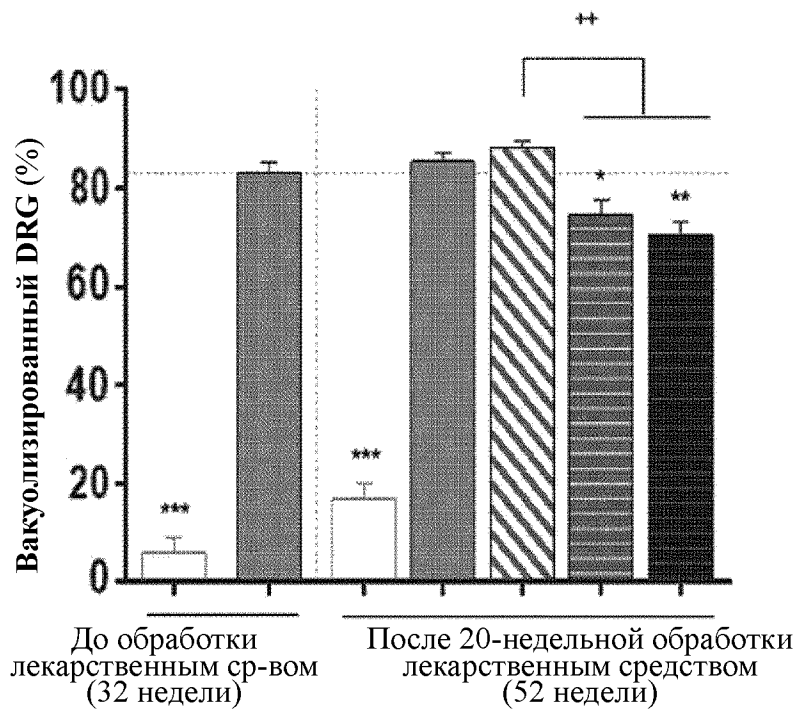
14. Фармацевтическая композиция по п. 1, где слитый с ферментом белок содержит мономер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

15. Фармацевтическая композиция по п. 1, где X и X' представляют собой ферменты, каждый из которых содержит одинаковую аминокислотную последовательность или отличающиеся друг от друга последовательности.

ФИГ. 1



ФИГ. 2



- Нормальная мышь > Разбавитель
- Мышь с нокаутом гена альфа-галактозидазы > Разбавитель
- ▨ Мышь с нокаутом гена альфа-галактозидазы > Агалзидаза-бета, 1,0 мг/кг
- Мышь с нокаутом гена альфа-галактозидазы > Слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, 1,0 мг/кг
- Мышь с нокаутом гена альфа-галактозидазы > Слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, 2,0 мг/кг