

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091239** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.09

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(51) Int. Cl. **C12N 9/96** (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
C12N 9/38 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) СЛИТЫЙ БЕЛОК НА ОСНОВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА, ИМЕЮЩИЙ НОВУЮ СТРУКТУРУ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **10-2017-0178378**

(32) **2017.12.22**

(33) **KR**

(86) **PCT/KR2018/016487**

(87) **WO 2019/125059 2019.06.27**

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

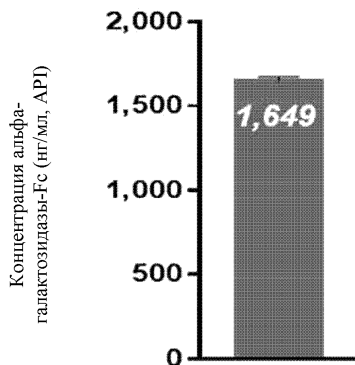
(72) Изобретатель:

**Чон Ый Чжун, Ким Джин Ён, Чой Ин
Юнг, Чун Сун Юб (KR)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к слитому белку, представляющему слияние между димерным терапевтическим ферментом и областью Fc иммуноглобулина, способу его получения и композиции, содержащей слитый белок.



A1

202091239

202091239

A1

РСТ/KR2018/016487

МПК: C12N 9/96 (2006.01) A61K 47/68 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/38 (2006.01)

СЛИТЫЙ БЕЛОК НА ОСНОВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА, ИМЕЮЩИЙ НОВУЮ СТРУКТУРУ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Техническая область

Настоящее изобретение относится к слитому белку на основе ферментов, содержащему димерный терапевтический фермент, способу его получения и содержащей его композиции.

Предшествующий уровень техники

Лизосомы представляют собой цитоплазматические органеллы, которые функционируют для разрушения макромолекул, таких как белки, полинуклеотиды, полисахариды и липиды. Внутренняя среда лизосом является кислой, и в них содержатся ферменты гидролазы, которые способствуют гидролизу биологических макромолекул. Также обнаружено, что лизосомы играют определенную роль в поглощении молекул путем внутриклеточного эндоцитоза.

Лизосомальные болезни накопления (далее LSD) представляют собой врожденные метаболические расстройства, характеризующиеся утратой лизосомальных функций. LSD вызваны дефицитом ферментов, которые разрушают вещества, такие как липиды, белки, полисахариды и т.д., и они обычно возникают с частотой 1 на 100000 и передаются как аутосомально-рецессивные признаки. LSD проявляются тогда, когда существует дефицит или утрата конкретных расщепляющих ферментов, и когда существует дефицит этих разрушающих ферментов, тогда образующиеся в результате избытки веществ накапливаются без разрушения, в итоге вызывая проблемы с клеточными функциями. Подобно многим другим генетическим расстройствам LSD передаются от родителей. Кроме того, каждое из этих заболеваний возникает вследствие мутации в каком-либо из генов, которые вовлечены в трансляцию различных ферментов. Ферменты, которые вызывают эти заболевания, обычно обладают сходными биохимическими свойствами, и все LSD вызываются аномальным накоплением веществ в лизосомах. В настоящее время

известно приблизительно 50 различных типов LSD (например болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Хантера, синдром Марото-Лами и т.п.).

Болезнь Фабри, известная как LSD, представляет собой вид врожденного метаболического расстройства гликофинголипидов, которое возникает в результате дефицита или утраты ферментативной активности *альфа*-галактозидазы А, представляющей собой гидролазу, находящуюся в лизосомах.

альфа-Галактозидаза А представляет собой фермент, который гидролизует глоботриаозилцерамид (Gb3) до лактозилцерамида, и известно, что нарушение *альфа*-галактозидазы А приводит к аномальному накоплению Gb3 в стенках кровеносных сосудов и различных частях организма, тем самым приводя к возникновению болезни Фабри.

Типичный способ лечения этих LSD может представлять собой фермент-заместительную терапию (ERT), и в настоящее время проводится множество связанных с этим исследований (Frances M. Platt *et al.*, *J Cell Biol.* 2012 Nov 26; 199 (5): 723-34). В частности, поскольку LSD представляют собой расстройства, вызванные генетическими дефектами в конкретных ферментах, заместительная терапия является жизненно необходимой для лечения дефицитных ферментов. Фермент-заместительная терапия представляет собой стандартную терапию при LSD, и эта терапия оказывает эффект облегчения существующих симптомов или замедления прогрессирования заболевания путем замещения дефицитного фермента.

Тем не менее, белки, демонстрирующие такие терапевтические эффекты, как правило обладают низкой стабильностью и поэтому легко денатурируют и разрушаются протеазами в крови. Таким образом, для поддержания концентрации в крови и эффективности этих белков необходимо частое введение пациентам.

Однако, в случае белковых лекарственных средств, вводимых пациентам в форме инъекций, частые инъекции для поддержания в крови концентрации активных полипептидов могут вызвать у пациента значительную боль. Для решения этих проблем осуществляются непрерывные попытки максимизировать фармакологическую эффективность путем повышения стабильности в крови терапевтических ферментов и поддержания их концентрации в крови на высоком уровне в течение более длительного периода времени. Такие композиции терапевтических ферментов длительного действия требуются для повышения стабильности терапевтических ферментов и для одновременного поддержания эффективности самих лекарственных средств на

достаточно высоком уровне, а также для того, чтобы не вызвать иммунную реакцию у пациентов.

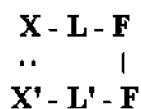
Соответственно, существует потребность в разработке терапевтического агента, обладающего терапевтическим эффектом в отношении интересующего заболевания, где активность слитого белка сохраняется при одновременном стабильном увеличении длительности существования слитого белка *in vivo*.

Описание изобретения

Техническая проблема

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить слитый белок на основе ферментов следующей формулы 1:

[Формула 1]



где каждый из X и X' независимо представляет собой терапевтический фермент одинакового или разного типа;

L и L' представляют собой линкеры, где каждый из линкеров независимо представляет собой линкер одинакового или разного типа;

F представляет собой область Fc иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения LSD, содержащую слитый белок на основе ферментов.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить полинуклеотид, кодирующий слитый белок на основе ферментов.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить трансформант, в который введен экспрессионный вектор.

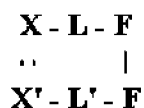
Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения слитого белка на основе ферментов, который включает выращивание трансформанта с получением культуры и выделение слитого белка на основе ферментов из культуры.

Техническое решение

В одном аспекте настоящего изобретения предложен слитый белок на основе ферментов, где терапевтический фермент и область Fc иммуноглобулина слиты друг с другом.

В конкретном воплощении настоящего изобретения слитый белок на основе ферментов может быть представлен следующей формулой 1:

[Формула 1]



где каждый из X и X' независимо представляет собой терапевтический фермент одинакового или разного типа;

L и L' представляют собой линкеры, где каждый из них независимо представляет собой линкер одинакового или разного типа;

F представляет собой область Fc иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с данными конкретными воплощениями терапевтические ферменты могут образовывать димер посредством нековалентной связи.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений терапевтические ферменты могут образовывать димер в антипараллельной конфигурации друг относительно друга.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений слитый белок на основе ферментов может обладать повышенной стабильностью и пониженной аффинностью связывания в отношении лизосомальных рецепторов по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым область Fc иммуноглобулина не слита.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений фермент может быть выбран из группы, состоящей из *бета*-глюкозидазы, *альфа*-галактозидазы, *бета*-галактозидазы, идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, галактозо-6-сульфатазы, кислой *альфа*-глюкозидазы, кислой церамидазы, кислой сфингомиелиназы, галактоцереброзидазы, арилсульфатазы A, B, *бета*-гексозаминидазы A, B, гепарин-N-сульфатазы, *альфа*-D-маннозидазы, *бета*-

глюкуронидазы, *N*-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, лизосомальной кислой липазы, *альфа-N*-ацетил-глюкозаминидазы, глюкоцереброзидазы, бутирилхолинэстеразы, хитиназы, глутаматдекарбоксилазы, имиглуцеразы, липазы, уриказы, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов, нейтральной эндопептидазы и миелопероксидазы.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений фермент может представлять собой *альфа*-галактозидазу А или *бета*-галактозидазу.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может иметь вариацию, выбранную из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, в по меньшей мере одной аминокислоте области Fc нативного иммуноглобулина.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений в области Fc иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 2-ая аминокислота может быть заменена на пролин; 71-ая аминокислота заменена на глутамин; или 2-ая аминокислота может быть заменена на пролин и 71-ая аминокислота может быть заменена на глутамин.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений никакой рекомбинации цепи не может возникать в области Fc иммуноглобулина.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может быть выбрана из группы, состоящей из:

(а) домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4;

(б) домена CH1 и домена CH2;

(в) домена CH1 и домена CH3;

(г) домена CH2 и домена CH3; и

(д) комбинации между одним или двумя или более чем двумя доменами среди домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина или части шарнирной области.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может находиться в форме мономера.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может состоять из шарнирной области, домена CH2 и домена CH3.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений в области Fc иммуноглобулина:

область, способная образовывать дисульфидную связь, может быть удалена;
определенный аминокислотный остаток может быть удален по N-концу нативного Fc;

остаток метионина может быть добавлен по N-концу нативной формы Fc;
сайт связывания комплемента может быть удален; или
сайт антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) может быть удален.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может быть агликозилирована.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может представлять собой фрагмент Fc, имеющий происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может представлять собой гибрид доменов, имеющих разное происхождение, полученных из иммуноглобулинов, выбранных из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений область Fc иммуноглобулина может представлять собой область Fc IgG4.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений шарнирная область области Fc IgG4 может быть заменена на шарнирную область IgG1.

В слитом белке на основе ферментов в соответствии с любым из данных конкретных воплощений слитый белок на основе ферментов может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения LSD, содержащая слитый белок на основе ферментов.

В композиции в соответствии с конкретным воплощением указанные LSD могут быть выбраны из группы, состоящей из мукополисахаридоза (MPS), болезни накопления гликогена, сфинголипидоза, болезни Ниманна-Пика, болезни Фабри, болезни Гоше, синдрома Хантера и синдрома Марото-Лами.

В композиции в соответствии с данным конкретным воплощением композиция может снижать аффинность связывания фермента в отношении лизосомальных рецепторов.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий слитый белок на основе ферментов.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен трансформант, в который введен экспрессионный вектор.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения слитого белка на основе ферментов.

В способе получения слитого белка на основе ферментов в соответствии с конкретным воплощением способ может включать выращивание трансформанта с получением культуры и выделение слитого белка на основе ферментов из культуры.

Благоприятные эффекты изобретения

Настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему димерный терапевтический фермент, и более конкретно, к слитому белку на основе ферментов, где область Fc иммуноглобулина слита с терапевтическим ферментом, так что этот терапевтический фермент обладает повышенной стабильностью, и сокращается механизм удаления фермента через почки. Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может быть эффективно использован пациентами благодаря увеличенной длительности существования. Кроме того, слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению содержит димерный терапевтический фермент, и, таким образом, можно сократить стадию приготовления, и стоимость производства может быть снижена.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 представлены результаты измерения, иллюстрирующие активность слитого белка *альфа*-галактозидазы–Fc.

На Фиг. 2 представлены результаты сравнения ферментативной активности *in vitro* между *бета*-агалзидазой и слитым белком *альфа*-галактозидаза–Fc.

На Фиг. 3 представлен график, иллюстрирующий результаты сравнения внутриклеточной абсорбционной активности *in vitro* между *бета*-агалтидазой и слитым белком *альфа*-галактозидаза–Fc.

На Фиг. 4 представлен график, иллюстрирующий результаты сравнения фармакокинетического поведения между *бета*-агалтидазой и слитым белком *альфа*-галактозидаза–Fc.

Подробное описание изобретения

Предпочтительные воплощения подробно описаны далее. В то же время, соответствующие описания и воплощения, раскрытые в описании настоящего изобретения, также могут быть применимы в отношении других описаний и воплощений. То есть, все комбинации различных элементов, раскрытых в описании настоящего изобретения, находятся в объеме настоящего изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не ограничивается нижеприведенным конкретным описанием.

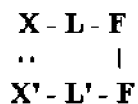
Дополнительно, специалист в данной области техники на основе стандартного экспериментирования способен выявить или идентифицировать множество эквивалентов конкретных воплощений настоящего изобретения, описанных в данном документе, и подразумевается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

На протяжении всего описания изобретения используют не только общепринятые однобуквенные или трехбуквенные коды для встречающихся в природе аминокислот, но также трехбуквенные коды, обычно принятые для других аминокислот, таких как α -аминомасляная кислота (Aib), Sar (*N*-метилглицин), α -метил-глутаминовая кислота и т.д. Кроме того, аминокислоты, упомянутые в приведенных здесь сокращениях, описаны в соответствии с правилами IUPAC-IUB (международный союз фундаментальной и прикладной химии-международный биохимический союз) следующим образом:

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; и	Валин	V.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен слитый белок на основе ферментов следующей формулы 1:

[Формула 1]



где каждый из X и X' независимо представляет собой терапевтический фермент одинакового или разного типа;

L и L' представляют собой линкеры, где каждый из линкеров независимо представляет собой линкер одинакового или разного типа;

F представляет собой область Fc иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Используемый здесь термин “слитый белок на основе ферментов” может относиться к слитому белку, в котором область Fc иммуноглобулина слита с терапевтическим ферментом таким образом, что этот терапевтический фермент может сохранять свою активность при одновременном снижении его аффинности связывания в отношении лизосомальных рецепторов по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым область Fc иммуноглобулина не слита, тем самым увеличивая период его полувыведения из крови. Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может быть использован в качестве лекарственного средства для ферментативной заместительной терапии (ERT). Ферментативная заместительная терапия может предупреждать или лечить заболевание путем восстановления функции нарушенного фермента посредством восполнения дефектного или утраченного фермента, который вызывает это заболевание.

Авторы настоящего изобретения получили слитый белок с областью Fc иммуноглобулина для увеличения периода полувыведения из крови терапевтических ферментов. В частности, в качестве области Fc использовали аналог Fc IgG4, где возможная последовательность для гликозилирования заменена для ингибирования гликозилирования и, кроме того, шарнирная последовательность Fc IgG4 заменена для ингибирования рекомбинации цепи.

Кроме того, подтверждено, что при получении слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению, когда каждый терапевтический фермент, слитый с областью Fc иммуноглобулина, образует димер, в частности, димер, связанный в антипараллельной

конфигурации, тогда длительность существования *in vivo* слитого белка на основе ферментов может быть увеличена при одновременном сохранении активности терапевтического фермента, и кроме того, стадия получения слитого белка на основе ферментов, может быть сокращена, тем самым обеспечивая высокую производительность.

Сам по себе слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению обладает преимуществами, заключающимися в том, что активность фермента может сохраняться при одновременном повышении стабильности фермента, и что стоимость получения может быть снижена по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым область Fc иммуноглобулина не слита.

Используемый здесь термин “терапевтический фермент” относится к ферменту для лечения заболеваний, которые возникают вследствие утраты, дефицита, нарушения функции и т.п. фермента, и фермент может лечить субъекта, страдающего от заболеваний, путем фермент-заместительной терапии, введения и т.п. В частности, фермент может представлять собой фермент для лечения LSD, которое может возникать в результате утраты, дефицита и т.п. лизосомального фермента, но фермент не ограничивается этим.

Терапевтический фермент, предназначенный для включения в слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению, конкретно не ограничен, но может включать любой терапевтический фермент, который может обладать преимуществом от увеличенного существования *in vivo* по сравнению с типом терапевтического фермента, с которым область Fc иммуноглобулина не слита. В примере воплощения настоящего изобретения слитый белок на основе ферментов представляет собой слитый белок терапевтического фермента.

Терапевтический фермент, предназначенный для включения в слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению, может представлять собой фермент, который образует димер посредством нековалентной связи, но терапевтический фермент не ограничивается этим. В частности, терапевтический фермент может образовывать димер, когда слитый белок экспрессируется в трансформанте и область Fc иммуноглобулина образует димер.

Такой димер терапевтических ферментов может представлять собой димер, образованный двумя ферментами, идентичными друг другу, или димер, образованный двумя разными ферментами. Конкретные виды ферментов, которые составляют димер, не ограничены, при условии что эти ферменты обладают желаемой активностью *in vivo*.

В то же время, эти терапевтические ферменты, составляющие димер, могут находиться в форме параллельного димера или антипараллельного димера в зависимости

от направления, в котором они связаны, но терапевтические ферменты не ограничиваются этим.

В примере воплощения настоящего изобретения получали слитый белок, где *альфа*-галактозидаза (т.е. терапевтический фермент) слита с областью Fc иммуноглобулина, и подтвердили, что *альфа*-галактозидазы образуют антипараллельный димер посредством нековалентной связи, тогда как области Fc иммуноглобулинов слитого белка образуют димер. Кроме того, подтвердили, что слитый белок может сохранять активность фермента даже в состоянии, когда слитый белок слит с областью Fc иммуноглобулина (Пример 2).

В еще одном примере воплощения настоящего изобретения сравнивали слитый белок, в котором *альфа*-галактозидаза слита с областью Fc иммуноглобулина, и *бета*-агалтидазу, которая не слита с областью Fc иммуноглобулина. В результате подтвердили, что слитый белок сохранял ферментативную активность *in vitro* и внутриклеточную абсорбционную активность несмотря на слияние с областью Fc (Примеры 2 и 3), и также подтвердили, что эти слитые белки обладают превосходным фармакокинетическим поведением вследствие слияния с областью Fc иммуноглобулина (Пример 4).

Используемый здесь термин “параллельный димер” означает, что N-конец и C-конец аминокислотной последовательности каждого мономера образуют димер в одинаковом направлении, когда каждый мономер образует димер. В частности, этот димер может образовываться посредством нековалентной связи или ковалентной связи, но способ образования параллельного димера не ограничивается этим.

Используемый здесь термин “антипараллельный димер” означает, что N-конец и C-конец аминокислотной последовательности каждого мономера образуют димер в разных направлениях друг относительно друга, когда каждый мономер образует димер. В частности, этот димер может быть получен посредством нековалентной связи или ковалентной связи, но способ образования антипараллельного димера не ограничивается этим.

Другими словами, в слитом белке на основе ферментов по настоящему изобретению возможно, что (1) N-конец одного терапевтического фермента (X) и N-конец другого терапевтического фермента (X') могут образовывать димер в одном и том же направлении; (2) C-конец одного терапевтического фермента (X) и C-конец другого терапевтического фермента (X') могут образовывать димер в одном и том же направлении; (3) N-конец одного терапевтического фермента (X) и C-конец другого терапевтического фермента (X') могут образовывать димер в одном и том же

направлении; или (4) С-конец одного терапевтического фермента (X) и N-конец другого терапевтического фермента (X') могут образовывать димер в одном и том же направлении. Димеры в случаях (1) и (2) называют параллельными димерами, а димеры в случаях (3) и (4) называют антипараллельными димерами. Образование этих димеров может осуществляться посредством ковалентной связи или нековалентной связи, но образование димера не ограничивается этим.

В частности, при образовании вышеприведенных димеров образование параллельного димера или антипараллельного димера может быть осуществлено таким образом, что как только области Fc иммуноглобулинов образуют димер, то *альфа*-галактозидаза А мономеров, связанных с ней, образует димер посредством ковалентно связанного или нековалентно связанного димера.

В отношении слитого белка, содержащего димерный терапевтический фермент в антипараллельной конфигурации в соответствии с настоящим изобретением, способ получения слитого белка обладает превосходными преимуществами, заключающимися в том, что количество стадий получения может быть сокращено в нем, тем самым снижая стоимость получения, и в том, что ферментативная активность может сохраняться при одновременном снижении нестабильности в типах димера вследствие изменения pH *in vivo*.

Терапевтический фермент по настоящему изобретению может представлять собой фермент, выбранный из группы, состоящей из *бета*-глюкозидазы, *альфа*-галактозидазы, *бета*-галактозидазы, идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, галактозо-6-сульфатазы, кислой *альфа*-глюкозидазы, кислой церамидазы, кислой сфингомиелиназы, галактоцереброзидазы, арилсульфатазы А, В, *бета*-гексозаминидазы А, В, гепарин-*N*-сульфатазы, *альфа*-D-маннозидазы, *бета*-глюкуронидазы, *N*-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, лизосомальной кислой липазы, *альфа*-*N*-ацетил-глюкозаминидазы, глюкоцереброзидазы, бутирилхолинэстеразы, хитиназы, глутаматдекарбоксилазы, имиглуцеразы, липазы, уриказы, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов, нейтральной эндопептидазы и миелопероксидазы. Терапевтический фермент по настоящему изобретению может представлять собой фермент человеческого происхождения, но любой терапевтический фермент, обладающий терапевтическим эффектом в отношении LSD, может быть включен в настоящее изобретение без ограничения независимо от происхождения или вида фермента.

Более конкретно, фермент может представлять собой *альфа*-галактозидазу А или *бета*-галактозидазу.

Используемый здесь термин “*альфа*-галактозидаза А” представляет собой фермент, присутствующий в лизосомах селезенки, головного мозга, печени и т.д, который гидролизует концевые *альфа*-галактозильные группировки в гликолипидах и гликопротеинах, и представляет собой гомодимерный гликопротеин. В частности, известно, что *альфа*-галактозидаза А гидролизует тригексозид церамида, катализирует гидролиз мелибиозы до галактозы и глюкозы, и, в частности, известно, что он ассоциирован с болезнью Фабри, LSD.

В настоящем изобретении *альфа*-галактозидаза А может быть использована взаимозаменяемо с *альфа*-агалзидазой или *бета*-агалзидазой (т.е. рекомбинантного типа), и любой фермент, который обладает эквивалентной активностью и демонстрирует терапевтический эффект в отношении LSD, может быть включен в объем настоящего изобретения без ограничения независимо от его последовательности, происхождения, способа получения и т.п. В частности, *альфа*-галактозидаза может кодироваться полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 и может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, но последовательности *альфа*-галактозидазы не ограничены ими.

Терапевтический фермент, включенный в слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению, может быть встречающегося в природе типа, и фрагмент, состоящий из части терапевтического фермента, или аналог терапевтического фермента, где вариация выбрана 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 активности встречающегося в природе типа терапевтического фермента.

Кроме того, аналог терапевтического фермента включает все ферменты, где одна или более чем одна аминокислота добавлена по N-концу и/или С-концу встречающегося в природе типа терапевтического фермента.

Для замены или добавления аминокислот могут быть использованы не только 20 аминокислот, обычно обнаруживаемые в человеческих белках, а также нетипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты. Коммерческие источники нетипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., Genzyme Pharmaceuticals и т.п. Пептиды, включающие эти аминокислоты, и нетипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например American Peptide Company, Bachem (USA) или Anygen (Korea), но коммерческие источники не ограничены ими.

Используемый здесь термин “фрагмент” относится к форме, в которой одна или более чем одна аминокислота по N- или C-концу нативного терапевтического фермента или аналога нативного терапевтического фермента удалена. Нативный терапевтический фермент или его аналог относится к объему настоящего изобретения независимо от размера фрагмента или вида аминокислоты, при условии что он обладает активностью терапевтического фермента.

Аналоги терапевтического фермента могут включать биологически сходные аналоги и биологически превосходящие аналоги соответствующих терапевтических ферментов. Например, в отношении биологически сходных аналогов, с учетом различия хозяина для их экспрессии по сравнению с известным терапевтическим ферментом, различия в свойствах гликозилирования и его степени, и различия в степени замен по конкретному аминокислотному остатку соответствующего фермента в свете стандартной последовательности, где степень замен не составляет 100% замен, они относятся к биологически сходным ферментам, используемым в качестве слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению. Терапевтические ферменты могут быть получены способом, известным в данной области техники, в частности, путем генетической рекомбинации в клетках животных, *E. coli*, дрожжей, клеток насекомых, клеток растений, живых животных и т.д, и способ получения не ограничивается ими, а имеющиеся в продаже ферменты могут быть приобретены и использованы, но ферменты не ограничиваются ими.

Кроме того, терапевтические ферменты могут включать аминокислотную последовательность, которая обладает гомологией по меньшей мере 60%, 70% или 80%, более предпочтительно 90%, и еще более предпочтительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или больше с последовательностью вышеприведенных ферментов или их аналогов, и терапевтические ферменты могут быть получены из микроорганизмов при помощи рекомбинантной технологии или представлять собой ферменты, имеющиеся в продаже, но терапевтические ферменты не ограничены ими.

Используемый здесь термин “гомология” представляет степень сходства с аминокислотной последовательностью дикого типа или нуклеотидной последовательностью дикого типа, и сравнение гомологии может быть осуществлено невооруженным взглядом или с использованием программы для сравнения, которая может быть легко приобретена. Гомологии между двумя или более чем двумя последовательностями могут быть рассчитаны в виде процентной доли (%) с

использованием имеющейся в продаже компьютерной программы. Гомология (%) может быть рассчитана для ближайших последовательностей.

Информация о последовательностях терапевтических ферментов или их аналогов и кодирующих их нуклеотидных последовательностях может быть получена из известных баз данных (например NCBI и т.п.).

Терапевтический фермент может быть получен или продуцирован способом, известным в данной области техники, и, в частности, фермент может быть очищен из культуры после выращивания клеток животных, в которые встроен экспрессирующийся у животных вектор, или может быть использован после приобретения имеющихся в продаже ферментов, но фермент не ограничивается ими.

Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может представлять собой белок, в котором терапевтический фермент и область Fc иммуноглобулина слиты посредством пептидного линкера. То есть, L или L' в формуле 1 может представлять собой пептидный линкер, но L или L' не ограничены конкретным образом, при условии что они способны образовывать слияние области Fc иммуноглобулина с терапевтическим ферментом.

Пептидный линкер может включать по меньшей мере одну аминокислоту, например от 1 до 1000 аминокислот, любой пептидный линкер, известный в данной области техники (например, включающий линкер $[GS]_x$, линкер $[GGGS]_x$ и линкер $[GGGGS]_x$ и т.п, где x представляет собой натуральное число 1 или больше (например 1, 2, 3, 4, 5 или больше), но пептидный линкер не ограничивается конкретно ими. В частности, пептидный линкер в соответствии с настоящим изобретением может состоять из последовательности от 10 до 50 аминокислот, и более конкретно из последовательности от 20 до 40 аминокислот, и может состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

Для задачи настоящего изобретения положение, по которому пептидный линкер слит с терапевтическим ферментом и Fc иммуноглобулина, не ограничено, при условии что пептидный линкер может связывать терапевтический фермент и Fc иммуноглобулина при одновременном сохранении активности терапевтического фермента, в частности, оба конца терапевтического фермента и область Fc иммуноглобулина, и более конкретно, С-конец терапевтического фермента и N-конец области Fc иммуноглобулина, но положение не ограничивается ими.

Используемые здесь термины “N-конец” и “С-конец” относятся к аминоконцу и карбоксильному концу белка, соответственно. Например, “N-конец” или “С-конец” может

включать не только наибольшую часть концевой аминокислотного остатка N-конца или C-конца, но также аминокислотные остатки, соседние с аминокислотным остатком N-конца или C-конца, и, в частности, с 1-го аминокислотного остатка по 20-ый аминокислотный остаток от самого конца, но N-конец или C-конец не ограничивается этим.

В одном воплощении настоящего изобретения слитый белок (SEQ ID NO: 13), в котором N-конец IgG4 слит с C-концом терапевтического фермента, получали путем синтеза таким образом, что *альфа*-галактозидазу (терапевтический фермент) подвергали слиянию с линкером-IgG4 на уровне генов, и было подтверждено, что слитый белок экспрессируется в трансформанте, в который этот слитый белок трансформирован (Пример 2).

В настоящем изобретении пептидный линкер может представлять собой линкер, связанный с каждой областью Fc иммуноглобулина димера, образованного областями Fc иммуноглобулинов мономеров, и линкеры, связанные с каждой областью Fc иммуноглобулина, могут быть одинакового или разного типа.

Область Fc иммуноглобулина, которая представляет собой группировку слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению, может представлять собой область, где димер образуется между областями Fc иммуноглобулинов каждого из мономеров.

Используемый здесь термин “область Fc иммуноглобулина” относится к области молекулы иммуноглобулина, имеющей константную область тяжелой цепи 2 (CH2) и/или константную область тяжелой цепи 3 (CH3), за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепей. Для задачи настоящего изобретения такая область Fc иммуноглобулина может включать модифицированную шарнирную область, но не ограничена этим. В частности, область Fc иммуноглобулина может представлять собой область, которая имеет вариацию, выбранную из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, в по меньшей мере одной аминокислоте области Fc нативного иммуноглобулина, но область Fc иммуноглобулина не ограничена этим.

Область Fc иммуноглобулина представляет собой вещество, используемое в качестве носителя при получении лекарственных средств, и исследования слитых белков с использованием области Fc иммуноглобулина в настоящее время активно проводятся для того, чтобы стабилизировать белки и предотвратить их выведение через почки. Иммуноглобулины представляют собой важные компоненты крови, и существует пять

различных типов (т.е. IgG, IgM, IgA, IgD и IgE). Наиболее часто используемый тип для исследований слитых белков представляет собой IgG, и его классифицируют на четыре подтипа. Слитые белки, получаемые с использованием Fc иммуноглобулина, могут увеличивать размер белка и тем самым предупреждать его удаление через почки, и также связываться с рецепторами FcRn, и, таким образом, играют роль в увеличении периода полувыведения из крови путем эндоцитоза и обратного захвата клетками.

Такая область Fc иммуноглобулина может включать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, и мономерные области Fc иммуноглобулинов могут образовывать димер за счет шарнирной области, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается этим. Кроме того, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой удлиненную область Fc, включающую всю или часть константной области тяжелой цепи 1 (CH1) и/или константной области легкой цепи 1 (CL1), за исключением вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при условии что область Fc иммуноглобулина обладает эффектом таким же или превосходящим эффект его нативного типа. Кроме того, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой область, в которой часть весьма длинной аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3, удалена.

В частности, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой область, выбранную из группы, состоящей из (а) домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4; (б) домена CH1 и домена CH2; (в) домена CH1 и домена CH3; (г) домена CH2 и домена CH3; и (д) комбинации между одним или двумя или более чем двумя доменами среди домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина или части шарнирной области, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается ими. Более конкретно, область Fc иммуноглобулина может представлять собой область, которая состоит из шарнирной области, домена CH2 и домена CH3, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается этим.

В одном воплощении шарнирная область может представлять собой область, в которой часть шарнирной последовательности, имеющей следующую аминокислотную последовательность, удалена или модифицирована:

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

В частности, шарнирная область может представлять собой область, имеющую вариацию, где часть шарнирной области удалена с включением только одного

цистеинового (Cys) остатка; или может представлять собой область, где сериновый (Ser) остаток, вовлеченный в рекомбинацию цепи, заменен на пролиновый (Pro) остаток, и более конкретно, область, где 2-ой серин шарнирной последовательности заменен на пролиновый остаток, но шарнирная область не ограничивается этим.

В настоящем изобретении область Fc иммуноглобулина может повышать стабильность слитого терапевтического фермента, в то же время предотвращая рекомбинацию цепи и образование мономеров в области Fc путем включения шарнирной области в своей нативной форме или модифицированной шарнирной области.

В настоящем изобретении область Fc иммуноглобулина может находиться в форме мономера, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается этим. В частности, область Fc иммуноглобулина, которая обозначена как F в формуле 1 выше, может находиться в форме мономера и экспрессироваться путем слияния с мономерным терапевтическим ферментом посредством пептидного линкера. Поскольку мономеры областей Fc иммуноглобулина образуют димер, терапевтический фермент, слитый с областью Fc иммуноглобулина, может образовывать димер посредством нековалентной связи, но не ограничивается этим.

Область Fc иммуноглобулина, используемая в качестве носителя лекарственного средства, обладает недостатком, заключающимся в том, что она может вызывать нежелательный иммунный ответ, например, имеющий эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Эти функции возникают при связывании области Fc иммуноглобулина с рецептором Fc или комплементом, или гликозилировании области Fc. Кроме того, весьма вероятно, что нестабильность самой Fc может возникать *in vivo*.

В настоящем изобретении авторы изобретения сделали попытки решить указанную выше проблему путем замены последовательности из шарнирной области в области Fc иммуноглобулина. В частности, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой область, в которой обеспечивающая высокий потенциал к гликозилированию последовательность заменена на регулируемую гликозилирование последовательность, или последовательность, вовлеченная в рекомбинацию цепи, заменена, или может соответствовать обоим случаям. Более конкретно, область Fc иммуноглобулина слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой не происходит рекомбинация цепи.

В частности, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой область, в которой 2-ая аминокислота и/или 71-ая аминокислота области Fc иммуноглобулина в SEQ ID NO: 8 заменена на другую аминокислоту для предотвращения рекомбинации цепи и N-гликозилирования. Более конкретно, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой 1) область, где 2-ая аминокислота (например серин) заменена на пролин, 2) область, где 71-ая аминокислота (например аспарагин) заменена на глутамин, или 3) область, где 2-ая аминокислота заменена на пролин и 71-ая аминокислота заменена на глутамин, и, в частности, область Fc иммуноглобулина представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается этим. Дополнительно к вариантам, описанным выше, область Fc иммуноглобулина может включать подходящий вариант в качестве носителя лекарственного средства для повышения стабильности терапевтического фермента.

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

В одном воплощении настоящего изобретения 2-ая аминокислота Fc иммуноглобулина заменена на пролин и 71-ая аминокислота Fc иммуноглобулина заменена на глутамин, и, таким образом, рекомбинация цепи и N-гликозилирование сокращены (Пример 1).

Используемый здесь термин “рекомбинация цепи” относится к проблеме, заключающейся в том, что когда Fc IgG4 используют в качестве носителя ядра слитого белка, тогда Fc IgG4 образует гибрид с IgG4, присутствующим *in vivo*, или находится в виде мономера и изменяет исходную структуру на структуру, обладающую низкой терапевтической активностью, и ранее сообщалось, что существуют значительные трудности тогда, когда ядро слитого белка, в котором белок является слитым, используют для терапевтических целей (van der Neut Kolfshoten, *et al.*, *Science*, 317:1554 -1557, 2007).

Кроме того, в еще одном конкретном воплощении, область Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением не только включает нативные аминокислотные последовательности, а также аналоги последовательностей. Аминокислотный аналог подразумевает, что вариация, выбранная из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, осуществлена в по меньшей мере одном аминокислотном остатке нативной аминокислотной последовательности.

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

Кроме того, возможны различные типы аналогов, например аналоги, в которых сайт, способный образовывать дисульфидную связь, удален; аналоги, в которых удалены несколько N-концевых аминокислот из нативного Fc; аналоги, в которых остаток метионина добавлен по N-концу нативного Fc и т.д. Кроме того, сайты связывания комплемента (например, сайты связывания C1q) или сайты антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) могут быть удалены для устранения эффекторной функции. Способы получения аналогов последовательности области Fc иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных заявок WO 97/34631, WO 96/32478 и др.

Аминокислотные замены в белковой или пептидной молекуле, которые не изменяют активности всей молекулы, хорошо известны в данной области техники (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее частые замены происходят между аминокислотными остатками 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 аминокислота может быть модифицирована путем фосфорилирования, сульфатирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и т.д.

Кроме того, вышеописанные аналоги Fc могут представлять собой аналоги, которые демонстрируют ту же самую биологическую активность, как и область Fc в соответствии с настоящим изобретением, но которые обладают повышенной структурной стабильностью области Fc против нагревания, pH и т.д.

Кроме того, такая область Fc может быть получена из нативного типа, выделенного у людей или животных (например коров, коз, свиней, мыши, кроликов, грызунов, крыс, морских свинок и т.п.) или может представлять собой рекомбинанты или их аналоги, полученные из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. Здесь область Fc может быть получена из нативного Fc путем выделения полноразмерных иммуноглобулинов из организмов человека или животного и их обработки протеазой. Папаин расщепляет нативную область Fc на области Fab и Fc, а обработка пепсином приводит в результате к получению фрагментов pF'c и F(ab)₂. Эти фрагменты могут быть подвергнуты гель-фильтрационной хроматографии для выделения Fc или pF'c. В более конкретном воплощении область Fc может представлять собой область Fc

рекомбинантного иммуноглобулина, где область Fc человеческого происхождения получена у микроорганизма.

Кроме того, область Fc иммуноглобулина может находиться в форме нативного гликана, удлинённых или укороченных гликанов по сравнению с его нативным типом, или в дегликозилированной или агликозилированной форме. Удлинение, укорочение или удаление гликанов Fc иммуноглобулина может быть достигнуто традиционными способами, такими как химический способ, ферментативный способ и способ генетической инженерии с использованием микроорганизма. В частности, область Fc иммуноглобулина, в которой гликаны удалены из области Fc, демонстрирует значительное снижение аффинности связывания в отношении комплемента (C1q) и снижение или устранение антителозависимой цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и, таким образом, она не вызывает нежелательные иммунные ответы *in vivo*. В этой связи область Fc иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной области Fc иммуноглобулина может представлять собой более подходящую форму для того, чтобы удовлетворять исходной задаче настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

Используемый здесь термин “дегликозилирование” относится к удалению сахарных группировок из области Fc при помощи фермента, а термин “агликозилирование” относится к негликозилированной области Fc, продуцируемой в прокариотах, более конкретно *E. coli*.

В то же время, область Fc иммуноглобулина может иметь происхождение из людей или животных (например коров, коз, свиней, мыши, кроликов, грызунов, крыс, морских свинок и т.п.), и, в более конкретном воплощении, она может иметь происхождение из людей.

Кроме того, область Fc иммуноглобулина может представлять собой область Fc, происходящую из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или гибрида. В более конкретном воплощении она может иметь происхождение из IgG или IgM, которые находятся среди наиболее распространенных белков в человеческой крови, и в еще более конкретном воплощении она может иметь происхождение из IgG, который, как известно, увеличивает период полувыведения лиганд-связывающих белков. В более конкретном воплощении область Fc иммуноглобулина может представлять собой область Fc IgG4, в еще более конкретном воплощении она может представлять собой агликозилированную область Fc, имеющую происхождение из человеческого IgG4, и в наиболее конкретном воплощении аминокислотная последовательность области Fc иммуноглобулина

представляет собой SEQ ID NO: 9, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность, может представлять собой SEQ ID NO: 7, но область Fc иммуноглобулина не ограничивается ими.

Используемый здесь термин “комбинация” означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные области Fc иммуноглобулина одного и того же происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. То есть, димер или мультимер может быть получен из двух или более чем двух фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и Fc IgE.

Кроме того, терапевтические ферменты или слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению могут представлять собой таковые, где N-конец и/или C-конец белков не модифицирован(ы), но для защиты терапевтических ферментов от протеаз и повышения стабильности терапевтических ферментов *in vivo* в объем белков по настоящему изобретению также включены те терапевтические ферменты или слитый белок на основе ферментов, в которых N-конец и/или C-конец терапевтических ферментов химически модифицирован или защищен при помощи органической группы, или N-конец терапевтических ферментов модифицирован путем добавления аминокислоты и т.п. Когда C-конец терапевтических ферментов не модифицирован, тогда концы терапевтических ферментов или слитых белков на основе ферментов по настоящему изобретению могут иметь C-конец, но терапевтические ферменты или слитые белки на основе ферментов по настоящему изобретению не ограничиваются конкретно ими.

В частности, поскольку N-конец и C-конец химически синтезированных белков обладают зарядами, N-конец может быть ацетилирован и/или C-конец может быть амидирован таким образом, чтобы удалить эти заряды, но способы не ограничиваются конкретно этим.

Если конкретно не определено в описании настоящего изобретения, то способы в отношении “фермента” или “слитого белка” по настоящему изобретению, описанные в подробном описании или формуле настоящего изобретения, будут применимы не только в отношении заявленного фермента или слитого белка, но также в объеме, который включает все соли заявленного фермента или слитого белка (например фармацевтически приемлемую соль слитого белка) или его сольват. Соответственно, хотя в описании настоящего изобретения объект изобретения просто описан как “фермент” или “слитый белок”, описание объекта изобретения будет аналогичным образом применимо в отношении конкретной соли, конкретного сольвата и конкретного сольвата конкретной

соли. Такие формы солей могут быть получены, например, с использованием любой фармацевтически приемлемой соли, но тип соли конкретно не ограничен. Эти формы солей могут представлять собой, например, соли, которые являются безопасными и эффективными в отношении млекопитающих, но формы солей не ограничиваются конкретно ими.

Используемый здесь термин “фармацевтически приемлемый” относится к веществу, которое может быть эффективно использовано для предполагаемого применения, не вызывая излишнюю токсичность, стимулирование или аллергические реакции и т.п. в пределах диапазона медико-фармацевтического решения.

Используемый здесь термин “фармацевтически приемлемая соль” относится к соли, полученной из фармацевтически приемлемых неорганических солей, органических солей или оснований. Примеры подходящих кислот могут включать соляную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, ортофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-*пара*-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и т.п. Примеры солей, полученных из подходящих оснований, могут включать щелочные металлы, такие как натрий, калий и т.п.; щелочно-земельные металлы, такие как магний; аммоний и т.п.

Кроме того, используемый здесь термин “сольват” относится к комплексу, образуемому между молекулой растворителя и ферментом, слитым белком по настоящему изобретению или его солью.

Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может быть получен способом, известным в данной области техники.

В одном воплощении настоящего изобретения получали рекомбинантный вектор, где *альфа*-галактозидаза (т.е. терапевтический фермент) может экспрессироваться в форме, слитой с пептидным линкером-Fc иммуноглобулина, и терапевтический фермент получали путем его экспрессии в клеточной линии СНО (клетки яичников китайского хомячка) (Примеры 1 и 2).

Однако, слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может быть получен способами, отличными от способов, описанных в вышеприведенных воплощениях. Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может

включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, но аминокислотная последовательность не ограничивается ими.

Слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению может увеличивать период полувыведения терапевтического фермента, который демонстрирует терапевтический эффект в отношении LSD, путем повышения стабильности *in vivo* терапевтического фермента при одновременном сохранении активности терапевтического фермента, путем слияния терапевтического фермента с областью Fc иммуноглобулина. В частности, терапевтический фермент, слитый с модифицированной областью Fc иммуноглобулина, обладает пониженными рекомбинацией цепи и гликозилированием и тем самым может обладать более низкой аффинностью связывания в отношении лизосомальных рецепторов по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым Fc не слита, и, таким образом, может обладать высокой длительностью существования, подтверждая то, что такой терапевтический фермент эффективен для лечения LSD.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения LSD, содержащая слитый белок на основе ферментов в качестве активного ингредиента.

Композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что длительность существования и стабильность терапевтического фермента *in vivo* увеличены.

В частности, слитый белок на основе ферментов в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может представлять собой белок, в котором *альфа*-галактозидаза A и область Fc иммуноглобулина слиты друг с другом, но слитый белок на основе ферментов не ограничивается этим.

Кроме того, композиция по настоящему изобретению может представлять собой композицию, где *альфа*-галактозидаза A (т.е. терапевтический фермент) в слитом белке также может образовывать димер, когда области Fc иммуноглобулина образуют димер, и более конкретно, димер *альфа*-галактозидазы A представляет собой димер, образуемый посредством общей нековалентной связи, и, в частности, характеризуется тем, что димер образуется в антипараллельной ориентации.

Используемый здесь термин “лизосома”, являясь одной из органелл, присутствующих в цитоплазме, содержит множество гидролаз и тем самым разрушает нежелательные вещества в организме, такие как макромолекулы, бактерии и т.п. и способствует утилизации разрушенных продуктов в других частях клетки. Функции лизосом могут осуществляться при помощи множества ферментов. Когда конкретный фермент утрачивает свою функцию вследствие вариации, дефицита и т.п. тогда он

приводит к утрате разрушающей функции лизосомы и приводит в результате к накоплению макромолекул и т.п, которые должны быть разрушены в клетке, и приводит к клеточному нарушению и т.п, тем самым вызывая заболевание.

Используемый здесь термин “лизосомальная болезнь накопления (LSD)” относится к редкому генетическому заболеванию вследствие утраты лизосомальных функций, описанных выше, и ферментативная заместительная терапия с использованием дефектного фермента является жизненно необходимой. LSD может включать мукополисахаридоз (MPS), болезни накопления гликогена, сфинголипидоз, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Хантера, синдрома Марото-Лами и т.п.

Используемый здесь термин “болезнь Фабри”, которая представляет собой LSD, передается в качестве рецессивной формы, ассоциированной с половыми хромосомами, и вызывается X-инактивацией. Болезнь Фабри представляет собой врожденное метаболическое расстройство гликосфинголипидов, которое возникает вследствие утраты или дефицита активности *альфа*-галактозидазы А, которая представляет собой гидролазу, присутствующую в лизосоме. Известно, что дефект *альфа*-галактозидазы А приводит к аномальному накоплению глоботриаозилцерамида (Gb3) в стенках кровеносных сосудов и различных частях тела (например, в коже, почке, сердце, нервной системе и т.п.) и, таким образом, нарушает кровообращение и уменьшает доставку питательных веществ. Могут проявляться симптомы ангидроза (утрата потоотделения), парестезия, тяжелые боли, ангиокератома, помутнение роговицы, ишемия сердца, инфаркт миокарда, почечная недостаточность и т.п, приводя в результате к почечной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти.

Используемый здесь термин “предупреждение” относится ко всем действиям, которые подавляют или замедляют возникновение LSD путем введения слитого белка на основе ферментов или композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов, и термин “лечение” относится ко всем действиям, которые улучшают или благоприятным образом изменяют симптомы LSD путем введения слитого белка на основе ферментов или композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов.

Используемый здесь термин “введение” относится к введению конкретного вещества пациенту с использованием подходящего способа, и путь введения композиции может представлять собой любой обычный путь, который обеспечивает доставку композиции к мишени *in vivo*, например, внутрибрюшинное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение,

пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, внутрилегочное введение, ректальное введение и т.д. Однако, поскольку пептиды разрушаются при пероральном введении, активные ингредиенты композиции для перорального введения предпочтительно покрыты или изготовлены для защиты от разрушения в желудке, и в частности, могут быть введены в инъекционной форме. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть введена с использованием определенного устройства, способного транспортировать активные ингредиенты в клетку-мишень.

Общая эффективная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть введена пациенту в разовой дозе или может быть введена в течение длительного периода времени в виде множества доз в соответствии с протоколом фракционированного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного ингредиента может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. В частности, общая суточная доза слитого белка по настоящему изобретению может составлять от приблизительно 0,0001 мг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Однако, эффективную дозу слитого белка определяют, учитывая различные факторы, включающие возраст пациента, массу тела, состояние здоровья, пол, тяжесть заболевания, диету, скорость выведения и т.д., в дополнение к пути введения и частоте введения фармацевтической композиции. В этом отношении, специалист в данной области техники может легко определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не ограничивается конкретно составом, путем введения и способом введения, при условии что она демонстрирует эффекты в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении действительная доза слитого белка на основе ферментов, используемого в качестве носителя, может быть определена в зависимости от типов терапевтического фермента, используемого в качестве активного ингредиента, вместе с различными факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст, пол и масса пациента, тяжесть заболевания и т.д. Поскольку слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению обладает значительно превосходящей длительностью существования *in vivo*, доза, количество и частота введения фармацевтической композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению, могут быть значительно сокращены.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Фармацевтически приемлемый носитель может не встречаться в природе.

Используемый здесь термин “фармацевтически приемлемый” относится к свойствам иметь достаточное количество для того, чтобы демонстрировать терапевтический эффект и не вызывать побочные эффекты и может быть легко определено специалистом в данной области техники на основе факторов, хорошо известных в области медицины, таких как вид заболевания, возраст, масса, состояние здоровья, пол, чувствительность пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, длительность лечения, лекарственное(ые) средство(а), смешиваемое(ые) или вводимое(ые) одновременно и т.д.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать, для перорального введения, связывающее вещество, скользящее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующий агент, диспергирующее вещество, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и т.д; для инъекций, буферный агент, консервант, обезболивающее средство, солюбилизующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент и т.д, которые можно комбинировать для использования; и для местных введений, основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и т.д.

Тип препарата для композиции по настоящему изобретению может быть изготовлен различным образом путем объединения с фармацевтически приемлемым носителем, описанным выше. Например, для перорального введения композиция может быть изготовлена в виде таблеток, троше, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п. Для инъекции композиция может быть изготовлена в содержащих единичную дозу ампулах или многодозовых контейнерах. Кроме того, композиция также может быть изготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, препаратов с длительным высвобождением и т.п.

В то же время примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.п. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, увлажнитель, корригент, консервант и т.п.

Кроме того, слитый белок на основе ферментов может быть использован путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, одобренными в качестве фармацевтических лекарственных средств, таких как физиологический раствор или органические растворители. Для повышения стабильности или абсорбционной способности углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, и антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы могут быть использованы в качестве фармацевтических лекарственных средств.

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

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению.

Полинуклеотид, кодирующий слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению, может представлять собой полинуклеотид в форме, в которой часть, кодирующая терапевтический фермент, и часть, кодирующая пептидный линкер-область Fc иммуноглобулина, связаны, и в частности, полинуклеотид, кодирующий слитый белок, где N-конец области Fc иммуноглобулина связан с C-концом терапевтического фермента через линкер GGGGS, но полинуклеотид не ограничивается этим. Более конкретно, полинуклеотид по настоящему изобретению может включать последовательность SEQ ID NO: 12, но последовательность не ограничивается этим, при условии что полинуклеотид может кодировать слитый белок, представляющий слияние между терапевтическим ферментом и областью Fc иммуноглобулина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид.

Используемый здесь термин “рекомбинантный вектор” относится к конструкции ДНК, в которой целевой пептид (например слитый белок на основе ферментов) функционально связан с подходящей контрольной последовательностью для обеспечения экспрессии данного целевого пептида (например слитого белка на основе ферментов) в подходящем хозяине. Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может быть сконструирован в виде вектора для типичного клонирования или в виде вектора для экспрессии и может быть сконструирован с использованием прокариотической клетки или эукариотической клетки в качестве клетки-хозяина.

Контрольная последовательность включает промотор, способный инициировать транскрипцию, любую операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий домен связывания рибосомальной мРНК, и последовательность, контролирующую прекращение транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор после трансформации в подходящую клетку-хозяин может реплицироваться или функционировать независимо от генома хозяина или может интегрироваться в геном самого хозяина.

Рекомбинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, может быть не ограничен на практике, при условии что вектор способен реплицироваться в клетке-хозяине, и он может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области техники. Примеры вектора могут включать природные или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Вектор, который может быть использован в настоящем изобретении, не ограничен на практике и может быть использован любой известный экспрессионный вектор.

Рекомбинантный вектор используют для трансформации клетки-хозяина для продуцирования слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению. Кроме того, эти трансформированные клетки, составляя часть настоящего изобретения, могут быть использованы для амплификации фрагментов нуклеиновой кислоты и векторов, или они могут представлять собой выращиваемые клетки или клеточные линии, используемые при рекомбинантном продуцировании слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению.

Используемый здесь термин “трансформация” относится к процессу введения рекомбинантного вектора, включающего полинуклеотид, кодирующий целевой белок (например, терапевтический фермент, слитый белок на основе ферментов) в клетку-хозяина, тем самым обеспечивая экспрессию белка, кодируемого этим полинуклеотидом, в клетке-хозяине. Для трансформированного полинуклеотида не имеет значения введен ли он в хромосому клетки-хозяина и локализован в ней или же он локализован вне хромосомы, при условии что он может экспрессироваться в клетке-хозяине, и включены оба случая.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид может быть встроен в любой форме, при условии что он может быть введен в клетку-хозяина и экспрессироваться в ней. Например, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина в форме экспрессионной кассеты, которая представляет собой генетическую конструкцию, включающую все необходимые

элементы, требуемые для ее самовыражения. Экспрессионная кассета может обычно включать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, сигнал прекращения транскрипции, домен связывания рибосомы и сигнал прекращения трансляции. Экспрессионная кассета может находиться в форме экспрессионного вектора, способного к саморепликации. Кроме того, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина сам по себе и функционально связан с последовательностью, необходимой для его экспрессии в клетке-хозяине, но полинуклеотид не ограничивается этим.

Кроме того, используемый здесь термин “функционально связанный” относится к функциональной связи между промоторной последовательностью, которая инициирует и опосредует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего целевой пептид в соответствии с настоящим изобретением, и вышеприведенной последовательностью генов.

Подходящий хозяин, используемый в настоящем изобретении, может быть не ограничен конкретным образом, при условии что он может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры подходящего хозяина могут включать бактерии, относящиеся к роду *Escherichia*, такие как *E. coli*; бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*; дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (Sf9); и клетки животных, такие как CHO, COS, BSC, и т.д.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен трансформант, в который введен экспрессионный вектор.

Для задачи настоящего изобретения трансформант, в который введен экспрессионный вектор по настоящему изобретению, может быть не ограничен, при условии что трансформант может экспрессировать и продуцировать слитый белок на основе ферментов, но трансформант может представлять собой бактерии, относящиеся к роду *Escherichia*, такие как *E. coli*; бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*; дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (Sf9); и клетки животных, такие как CHO, COS, BSC, и т.д.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению.

В частности, способ может включать (а) выращивание трансформанта с получением культуры; и (б) выделение слитого белка на основе ферментов из культуры, но способ не ограничивается этим.

В настоящем изобретении среда, используемая для выращивания трансформанта, должна удовлетворять требованиям для выращивания клеток-хозяев подходящим образом. Источники углерода, которые могут содержаться в среде для роста клетки-хозяина, могут быть подходящим образом выбраны по решению специалиста в данной области техники в соответствии с типом получаемого трансформанта, и подходящие условия выращивания могут быть выбраны для того, чтобы контролировать длительность и количество выращиваний.

Примеры источника сахара, используемого в среде, могут включать сахара и углеводы, такие как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтоза, крахмал и целлюлоза; масла и жиры, такие как соевое масло, подсолнечное масло, касторовое масло и кокосовое масло; жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и линолевая кислота; спирты, такие как глицерин и этанол; и органические кислоты, такие как уксусная кислота. Эти вещества могут быть использованы отдельно или в комбинации.

Примеры используемого источника азота могут включать пептон, дрожжевой экстракт, мясной бульон, солодовый экстракт, кукурузный сироп, соевую муку и мочевины, или неорганические соединения, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония. Источник азота также может быть использован отдельно или в комбинации.

Примеры используемого источника фосфора могут включать дигидрофосфат калия или гидрофосфат калия или соответствующую натрий-содержащую соль. Кроме того, культуральная среда может содержать соль металла, такую как сульфат магния или сульфат железа, необходимые для роста.

Наконец, могут быть использованы необходимые для роста вещества, такие как аминокислоты и витамины. Кроме того, также могут быть использованы подходящие предшественники для культуральной среды. Вышеприведенные источники подходящим образом могут быть добавлены к культуре во время выращивания периодической культуры или непрерывной культуры. pH культуры может быть подходящим образом скорректирован с использованием основного соединения, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия и аммоний, или кислотного соединения, такого как ортофосфорная кислота или серная кислота. Кроме того, пеногаситель, такой как полигликолевый эфир

жирной кислоты, может быть добавлен для предупреждения образования пены. Кроме того, для поддержания аэробного состояния культуры в культуру можно вводить кислород или кислородсодержащий газ (например воздух).

Трансформант по настоящему изобретению можно выращивать при температуре от 20°C до 45°C и, в частности, от 25°C до 40°C. Кроме того, выращивание продолжают до достижения максимального продуцирования целевого терапевтического фермента или слитого белка на основе ферментов, и в этой связи выращивание может обычно продолжаться в течение от 10 часов до 160 часов.

Как описано выше, трансформант по настоящему изобретению может продуцировать терапевтический фермент или слитый белок на основе ферментов, когда соответствующие культуральные условия обеспечиваются в соответствии с клеткой-хозяином, и терапевтический фермент или слитый белок на основе ферментов, продуцируемый в соответствии со структурой вектора и характеристиками клетки-хозяина, может секретироваться в цитоплазму или в периплазматическое пространство клетки-хозяина или внеклеточно.

Белки, экспрессирующиеся в пределах или вне клетки-хозяина, могут быть очищены обычным способом. Примеры способа очистки могут включать высаливание (например осаждение сульфатом аммония, осаждение фосфатом натрия и т.п.), осаждение растворителем (например осаждение белковой фракции с использованием ацетона или этанола и т.п.), диализ, гель-фильтрацию, ионный обмен или хроматографию, такую как обращенная колоночная хроматография, ультрафильтрацию и т.д. и эти способы могут быть использованы отдельно или в комбинации.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ, который включает введение субъекту слитого белка на основе ферментов или композиции для предупреждения или лечения LSD, содержащей слитый белок на основе ферментов.

Поскольку слитый белок на основе ферментов по настоящему изобретению содержит терапевтический фермент, который может предупреждать или лечить LSD, LSD можно предупреждать или лечить путем введения субъекту, у которого подозревается наличие LSD, слитого белка на основе ферментов, содержащего терапевтический фермент, или фармацевтической композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов.

Используемый здесь термин “субъект” относится к субъекту, у которого подозревается наличие LSD, и субъект, у которого подозревается наличие LSD, относится к млекопитающим, включая людей, крыс, крупного рогатого скота и т.д. у которых

имеется LSD или которые имеют риск развития LSD, но любой субъект, которого можно лечить с использованием слитого белка на основе ферментов по настоящему изобретению или композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов, включен без ограничения.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов. Подходящая общая суточная доза композиции может быть определена в пределах надлежащего медицинского суждения практикующим врачом, и композиция может быть введена однократно или несколько раз дробными дозами в течение суток. Однако, для задачи настоящего изобретения предпочтительно конкретная терапевтически эффективная доза композиции для любого конкретного пациента применяется дифференцировано в зависимости от различных факторов, включающих вид и степень достигаемых ответов, конкретные композиции, включающие другие агенты, которые в отдельных случаях используются с ними, возраст пациента, масса, состояние здоровья, пол и диета, время введения, путь введения, скорость выведения композиции, длительность лечения, другие лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

В то же время, способ предупреждения или лечения LSD может представлять собой комбинированную терапию, которая дополнительно включает введение соединения или вещества, обладающего терапевтическим эффектом в отношении по меньшей мере одного из LSD, но способ не ограничивается этим.

Используемый здесь термин “комбинация” следует понимать как относящийся к одновременному, раздельному или последовательному введению. Когда введение является последовательным или раздельным, тогда интервал, отведенный для введения второго ингредиента, должен быть таким, который не должен приводить к утрате благоприятных действий комбинации.

Вводимая доза слитого белка на основе ферментов, обладающая терапевтической активностью в отношении LSD, может составлять от приблизительно 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента, но доза конкретно не ограничена.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение слитого белка на основе ферментов или композиции, содержащей слитый белок на основе ферментов, в изготовлении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения LSD.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно путем ссылки на следующие примеры. Тем не менее, эти примеры приведены исключительно для иллюстративных задач, и объем изобретения не ограничивается этими примерами.

Пример 1: Получение слитого белка на основе ферментов

Для продуцирования слитого белка на основе ферментов, включающего терапевтический фермент в форме антипараллельного димера, авторы настоящего изобретения осуществили слияние нативной *альфа*-галактозидазы, линкера (SEQ ID NO: 10) и области Fc иммуноглобулина (SEQ ID NO: 7) на уровне генов и встроили этот слитый продукт в экспрессионный вектор.

Для удаления сайтов рекомбинации цепи и N-гликозилирования в областях Fc сконструированного слитого белка использовали методику ПЦР (полимеразная цепная реакция) для сайт-направленного мутагенеза.

В частности, 2-ую аминокислоту области Fc (т.е. серин), вовлеченную в рекомбинацию цепи, заменили на пролин с использованием праймеров (SEQ ID NO: 1 и 2), и 71-ую аминокислоту области Fc (т.е. аспарагин), вовлеченную в N-гликозилирование, заменили на глутамин с использованием праймеров (SEQ ID NO: 3 и 4) из области Fc (SEQ ID NO: 8).

[Таблица 1] Праймеры для мутагенеза

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO
Fc(S2P)_F	5'- CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCT-3'	1
Fc(S2P)_R	5'- AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3'	2
Fc(N71Q)_F	5'- AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAG-3'	3
Fc(N71Q)_R	5'- CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAAGTCTCCTCCCGCGGCT-3'	4

Полинуклеотид, кодирующий синтезированный слитый белок *альфа*-галактозидаза-Fc, встраивали в экспрессионный вектор (вектор XOGC) с использованием ферментов рестрикции. Как *Bam*HI, так и *Xho*I представляют собой ферменты рестрикции, которые не расщепляют *альфа*-галактозидазу и области Fc иммуноглобулина. *Альфа*-

галактозидаза–Fc, расщепленный с использованием вышеприведенных ферментов рестрикции, встраивали в вектор XOGC, расщепленный с использованием тех же ферментов рестрикции, и, таким образом, получили вектор, способный экспрессировать слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc. *Альфа*-галактозидаза образует антипараллельный димер, когда области Fc иммуноглобулина образуют димер.

Последовательность ДНК и белковые последовательности *альфа*-галактозидазы-представлены в Таблице 2 ниже, где подчеркнутые участки представляют сигнальную последовательность, выделенные жирным шрифтом участки представляют замену аминокислот, и выделенные курсивом участки представляют линкеры.

[Таблица 2] Последовательность ДНК и белковая последовательность слитого белка на основе ферментов

Название	Последовательность			SEQ ID NO	
альфа-Галактози-даза–Fc	ДНК	<u>ATGCAGCTGA</u>	<u>GGAACCCAGA</u>	<u>ACTACATCTG</u>	12
		<u>GGCTGCGCGC</u>	<u>TTGCGCTTCG</u>	<u>CTTCCTGGCC</u>	
		<u>CTCGTTTCCT</u>	<u>GGGACATCCC</u>	<u>TGGGGCTAGA</u>	
		<u>GCACTGGACA</u>	ATGGATTGGC	AAGGACGCCT	
		ACCATGGGCT	GGCTGCACTG	GGAGCGCTTC	
		ATGTGCAACC	TTGACTGCCA	GGAAGAGCCA	
		GATTCCTGCA	TCAGTGAGAA	GCTCTTCATG	
		GAGATGGCAG	AGCTCATGGT	CTCAGAAGGC	
		TGGAAGGATG	CAGGTTATGA	GTACCTCTGC	
		ATTGATGACT	GTTGGATGGC	TCCCCAAAGA	
		GATTCAGAAG	GCAGACTTCA	GGCAGACCCT	
		CAGCGCTTTC	CTCATGGGAT	TCGCCAGCTA	
		GCTAATTATG	TTCACAGCAA	AGGACTGAAG	
		CTAGGGATTT	ATGCAGATGT	TGGAAATAAA	
		ACCTGCGCAG	GCTTCCCTGG	GAGTTTGGGA	
		TACTACGACA	TTGATGCCCA	GACCTTTGCT	
		GACTGGGGAG	TAGATCTGCT	AAAATTTGAT	
		GGTTGTTACT	GTGACAGTTT	GGAAAATTTG	
		GCAGATGGTT	ATAAGCACAT	GTCTTGCC	
		CTGAATAGGA	CTGGCAGAAG	CATTGTGTAC	
		TCCTGTGAGT	GGCCTCTTTA	TATGTGGCCC	
		TTTCAAAAGC	CCAATTATAC	AGAAATCCGA	
		CAGTACTGCA	ATCACTGGCG	AAATTTTGCT	
		GACATTGATG	ATTCCTGGAA	AAGTATAAAG	
		AGTATCTTGG	ACTGGACATC	TTTAAACCAG	
		GAGAGAATTG	TTGATGTTGC	TGGACCAGGG	
		GGTTGGAATG	ACCCAGATAT	GTTAGTGATT	
		GGCAACTTTG	GCCTCAGCTG	GAATCAGCAA	
		GTAACCTCAGA	TGGCCCTCTG	GGCTATCATG	
		GCTGCTCCTT	TATTCATGTC	TAATGACCTC	
		CGACACATCA	GCCCTCAAGC	CAAAGCTCTC	
		CTTCAGGATA	AGGACGTAAT	TGCCATCAAT	

		CAGGACCCCT	TGGGCAAGCA	AGGGTACCAG	
		CTTAGACAGG	GAGACAACCT	TGAAGTGTGG	
		GAACGACCTC	TCTCAGGCTT	AGCCTGGGCT	
		GTAGCTATGA	TAAACCGGCA	GGAGATTGGT	
		GGACCTCGCT	CTTATACCAT	CGCAGTTGCT	
		TCCCTGGGTA	AAGGAGTGGC	CTGTAATCCT	
		GCCTGCTTCA	TCACACAGCT	CCTCCCTGTG	
		AAAAGGAAGC	TAGGGTTCTA	TGAATGGACT	
		TCAAGGTAA	GAAGTCACAT	AAATCCCACA	
		GGCACTGTTT	TGCTTCAGCT	AGAAAATACA	
		ATGCAGATGT	CATTAAAAGA	CTTACTTGGC	
		<i>GGCGGAGGTT</i>	<i>CAGGTGGTGG</i>	<i>TGGCTCTGGC</i>	
		<i>GGTGGAGGGT</i>	<i>CGGGGGGAGG</i>	<i>CGGCTCTGGA</i>	
		<i>GGAGGGGGCT</i>	<i>CCGGTGGGGG</i>	<i>AGGTAGCCCA</i>	
		CCATGCCCAG	CACCTGAGTT		
		CCTGGGGGGA	CCATCAGTCT	TCCTGTTCCC	
		CCCAAAACCC	AAGGACACCC		
		TCATGATCTC	CCGGACCCCT	GAGGTCACAT	
		GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC		
		CAGGAAGACC	CTGAGGTCCA	GTTCAACTGG	
		TACGTGGACG	GCGTGGAGGT		
		GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	
		GCAGTTCCAA	AGCACGTACC		
		GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC	
		AGGACTGGCT	GAATGGCAAG		
		GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGGC	
		CTCCCATCCT	CCATCGAGAA		
		AACCATCTCC	AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	
		AGAACCACAG	GTGTACACCC		
		TGCCCCCATC	CCAGGAGGAG	ATGACCAAGA	
		ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC		
		CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	
		GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA		
		TGGGCAGCCG	GAGAACAACCT	ACAAGACCAC	
		GCCTCCCGTG	CTGGACTCCG		

		ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	
	Белок	<u>MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR</u> <u>ALDNLARTP TMGWLHWERF MCNLDQEEP</u> DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAPQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTEA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSWKSII SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPAKAL LQDKDVIIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA 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 ENNYKTTPPV LDSDGFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	13

Вектор, экспрессирующий слитый белок на основе ферментов, полученный в Примере 1, назван как *альфа*-галактозидаза–Fc.

Пример 2: Подтверждение ферментативной активности *in vitro* слитого белка на основе ферментов

Пример 2-1: Получение слитого белка *альфа*-галактозидаза–Fc

Вектор, экспрессирующий *альфа*-галактозидазу–Fc (pX0GC–*альфа*-галактозидаза–Fc), полученный в Примере 1, трансформировали в клеточную линию CHO-S и, таким образом, получили клеточную линию, способную к крупномасштабному производству слитого белка *альфа*-галактозидаза–Fc.

В частности, клеткам CHO-S обеспечивали возможность пролиферации путем суспендирования культуры в колбе Эрленмейера емкостью 1 л (Corning Inc., кат. № 431147) с использованием бессывороточной среды (среда для экспрессии в CHO FreeStyle™, Thermo Fisher Scientific, кат. № 12651014). Когда клетки в культуральном контейнере достигали конфлюэнтности 5×10^8 клеток, их трансформировали с использованием FreeStyle™ MAX (Thermo Fisher Scientific, кат. № 16447-100). То есть, в каждую из двух пробирок независимо загружали 10 мл OptiPro™ SFM (Thermo Fisher Scientific, кат. № 12309-019), и затем в одну пробирку загружали 500 мкг ДНК, а в другую пробирку загружали 500 мкл FreeStyle™ MAX. Два раствора в каждой из пробирок смешивали, выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут и добавляли в клетки, в которых среду заранее заменили на свежую среду для экспрессии в CHO FreeStyle™ (Thermo Fisher Scientific, кат. № 12651014), соответственно. Клетки выращивали в инкубаторе (37°C, 5% CO₂) при скорости перемешивания 125 об/мин в течение приблизительно 96 часов.

Затем культуральный супернатант удаляли путем центрифугирования на 4-ые сутки и ферментативную активность *in vitro* измеряли, с тем чтобы проверить изменения ферментативной активности в соответствии с продуцированием *альфа*-галактозидазы–Fc.

Пример 2-2: Подтверждение ферментативной активности *альфа*-галактозидазы–Fc *in vitro*

Для проверки ферментативной активности *альфа*-галактозидазы–Fc *in vitro* продуцированный слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc оставляли для достижения температурного равновесия с pNP-gal (*пара*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид), представляющем собой известный субстрат для ферментов, при 37°C в течение 30 минут. Затем раствор субстрата приводили во взаимодействие с *альфа*-галактозидазой–Fc при 37°C в течение 30 минут, и поглощение полученного в результате раствора измеряли, с тем чтобы измерить ферментативную активность *альфа*-галактозидазы–Fc *in vitro*.

В результате измерения ферментативной активности *in vitro* было подтверждено, что уровень экспрессии *альфа*-галактозидазы–Fc составил 1,649 нг/мл (Фиг. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что *альфа*-галактозидаза слитого белка на основе

ферментов по настоящему изобретению образует антипараллельный димер, и что *альфа*-галактозидаза антипараллельного димера сохраняет ферментативную активность на значительном уровне.

Пример 2-3: Сравнение ферментативной активности *in vitro* между *альфа*-галактозидазой и *альфа*-галактозидазой-Fc

В то же время, ферментативную активность *in vitro* слитого белка *альфа*-галактозидаза-Fc, полученного в Примере 1, сравнивали с активностью *бета*-агалзидазы, с которой область Fc не была связана.

В частности, *альфа*-галактозидазу-Fc и *бета*-агалзидазу оставляли для достижения температурного равновесия с pNP-gal (*пара*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид), представляющем собой субстрат для ферментов, при 37°C в течение 30 минут. Затем раствор субстрата приводили во взаимодействие со слитым белком *альфа*-галактозидаза-Fc при 37°C в течение 20 минут. Затем поглощение полученного в результате 4-нитрофенола измеряли, с тем чтобы сравнить ферментативную активность *альфа*-галактозидазы-Fc и *бета*-агалзидазы.

В результате было подтверждено, что ферментативная активность (специфическая активность) *альфа*-галактозидазы-Fc и *бета*-агалзидазы составила 70,9 мкмоль/мин/мг и 67,6 мкмоль/мин/мг, соответственно (Фиг. 2). На основе этих результатов было подтверждено, что слитый белок *альфа*-галактозидаза-Fc обладает ферментативной активностью 95,4%, которая находится на уровне, близком к активности фермента, с которым область Fc не была связана. Последнее означает, что слитый белок *альфа*-галактозидаза-Fc по настоящему изобретению не утратил свою ферментативную активность даже тогда, когда с ним связана область Fc.

Пример 3: Подтверждение внутриклеточной абсорбционной активности *альфа*-галактозидазы-Fc *in vitro*

Известно, что *альфа*-галактозидаза действует посредством рецепторов маннозо-6-фосфата (M6PR) после абсорбции клетками. Таким образом, авторы настоящего изобретения подтвердили клеточную абсорбционную активность, демонстрируемую слитым белком *альфа*-галактозидаза-Fc, следующим образом.

В частности, клетки CCD986SK (фибробласты человеческой кожи), которые, как известно, экспрессируют M6PR, обрабатывали каждым из *бета*-агалзидазы и слитого белка *альфа*-галактозидаза-Fc, и внутриклеточную абсорбцию индуцировали при 37°C. Через 24 часа присутствие *бета*-агалзидазы и слитого белка *альфа*-галактозидаза-Fc подтверждали с использованием способа измерения ферментативной активности.

В результате анализа корреляции между концентрацией слитого белка *альфа*-галактозидаза–Fc и его внутриклеточной абсорбцией обнаружено, что величина K_m , которая представляет собой константу Михаэлиса-Ментена, которая представляет собой половину максимальной скорости поглощения, составляет 11,55 нМ, тем самым демонстрируя уровень внутриклеточной абсорбционной активности, подобный таковому для *бета*-агалзидазы ($K_m=10,92$ нМ) (Фиг. 3). На основании этих результатов подтвердили, что слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc по настоящему изобретению не утрачивает своей внутриклеточной абсорбционной активности даже тогда, когда с ним связана область Fc.

Пример 5: Подтверждение фармакокинетического поведения слитого белка *альфа*-галактозидаза–Fc у мышей ICR

Стабильность в крови и фармакокинетические коэффициенты для *бета*-агалзидазы (контрольная группа) и слитого белка *альфа*-галактозидаза–Fc (тестируемая группа), который был получен в Примере, для собранного образца крови в соответствии с каждой из групп сравнивали для мышей ICR (3 мыши/группу) для каждого момента сбора образца крови.

В частности, исходя из агалзидазы, *бета*-агалзидазу (контрольная группа) и слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc (тестируемая группа) вводили мышам ICR, соответственно, в контрольной группе и экспериментальной группе путем внутривенных и подкожных инъекций в концентрации 1,0 мг/кг. Образцы крови отбирали в группе, которой осуществляли внутривенную инъекцию, через 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 и 4 часа после инъекции, и в группе, которой осуществляли подкожную инъекцию, через 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 и 216 часов после инъекции. Количества белков в сыворотке крови определяли путем измерения ферментативной активности *in vitro*.

В результате слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc продемонстрировал увеличение во всех показателях периода полувыведения ($T_{1/2}$), максимальной концентрации лекарственного средства в крови (C_{max}) и площади под кривой (AUC) по сравнению с контрольной группой, с которой область Fc не была связана. AUC представляет уровень воздействия *in vivo* молекул лекарственного средства (Фиг. 4, Таблица 3). На основе этих результатов подтвердили, что слитый белок *альфа*-галактозидаза–Fc по настоящему изобретению независимо от пути введения демонстрирует высокий уровень периода полувыведения из крови, максимальную концентрацию лекарственного средства в крови (C_{max}) и биологическую доступность *in vivo* (AUC) вследствие связывания с областью Fc.

[Таблица 3] Фармакокинетические параметры *бета*-агалзидазы и слитых белков *альфа*-галактозидаза–Fc

Вещество	Путь введения	AUC _{последн.} (нг*ч/мл)	C _{max} (нг/мл)	T _{1/2} (ч)	MRT _{последн.} (ч)
<i>бета</i> -Агалзидаза	Внутривенный	798,4	5108,5	НП	0,2
Слитый белок <i>альфа</i> -галактозидаза–Fc	Внутривенный	74553,6	2908,9	60,8	42,0
Слитый белок <i>альфа</i> -галактозидаза–Fc	Подкожный	59017,1	706,6	58,2	57,5

*НП = Не применимо

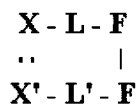
Эти результаты свидетельствуют о том, что новый тип слитого белка по настоящему изобретению, который способен увеличивать период полувыведения и *in vivo* биологическую доступность *альфа*-галактозидазы (т.е. пример тех терапевтических ферментов, которые, как известно, обладают терапевтическим эффектом в отношении LSD), может быть использован в качестве терапевтического агента для LSD, будучи способным сохранять активность фермента.

Исходя из вышеприведенного специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, способен понять, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без модификации технических концепций или существенных характеристик настоящего изобретения. В этой связи примеры раскрытых здесь воплощений приведены только для иллюстративных целей, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Напротив, предусматривается, что настоящее изобретение охватывает не только примеры воплощений, но также различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть включены в сущность и объем настоящего изобретения, определенный в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок на основе ферментов следующей формулы 1:

[Формула 1]



где каждый из X и X' независимо представляет собой терапевтический фермент одинакового или разного типа;

L и L' представляют собой линкеры, где каждый независимо представляет собой линкер одинакового или разного типа;

F представляет собой область Fc иммуноглобулина;

| представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

2. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где терапевтический фермент образует димер посредством нековалентной связи.

3. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где терапевтические ферменты образуют димер в антипараллельной конфигурации друг относительно друга.

4. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, обладающий повышенной стабильностью и пониженной аффинностью связывания в отношении лизосомальных рецепторов по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым область Fc иммуноглобулина не слита.

5. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где фермент выбран из группы, состоящей из *бета*-глюкозидазы, *альфа*-галактозидазы, *бета*-галактозидазы, идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, галактозо-6-сульфатазы, кислой *альфа*-глюкозидазы, кислой церамидазы, кислой сфингомиелиназы, галактоцереброзидазы, арилсульфатазы А, В, *бета*-гексозаминидазы А, В, гепарин-N-сульфатазы, *альфа*-D-маннозидазы, *бета*-глюкуронидазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, лизосомальной кислой липазы, *альфа*-N-ацетил-глюкозаминидазы, глюкоцереброзидазы, бутирилхолинэстеразы, хитиназы, глутаматдекарбоксилазы, имиглоцеразы, липазы, уриказы, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов, нейтральной эндопептидазы и миелопероксидазы.

6. Слитый белок на основе ферментов по п. 5, где фермент представляет собой *альфа*-галактозидазу А или *бета*-галактозидазу.

7. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина имеет вариацию, выбранную из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, в по меньшей мере одной аминокислоте области Fc нативного иммуноглобулина.

8. Слитый белок на основе ферментов по п. 7, где в области Fc иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 2-ая аминокислота заменена на пролин; 71-ая аминокислота заменена на глутамин; или 2-ая аминокислота заменена на пролин и 71-ая аминокислота заменена на глутамин.

9. Слитый белок на основе ферментов по п. 8, где в области Fc иммуноглобулина не происходит рекомбинация цепи.

10. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из:

(а) домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4;

(б) домена CH1 и домена CH2;

(в) домена CH1 и домена CH3;

(г) домена CH2 и домена CH3; и

(д) комбинации между одним или двумя или более чем двумя доменами среди домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина или части шарнирной области.

11. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина находится в форме мономера.

12. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина состоит из шарнирной области, домена CH2 и домена CH3.

13. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где в области Fc иммуноглобулина:

(а) область, способная образовывать дисульфидную связь, удалена;

(б) определенный аминокислотный остаток удален по N-концу нативного Fc;

(в) остаток метионина добавлен по N-концу нативной формы Fc;

(г) сайт связывания комплемента удален; или

(д) сайт антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) удален.

14. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина агликозилирована.

15. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина представляет собой фрагмент Fc, имеющий происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

16. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, где область Fc иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, имеющих разное происхождение, полученных из иммуноглобулинов, выбранных из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

17. Слитый белок на основе ферментов по п. 16, где область Fc иммуноглобулина представляет собой область Fc IgG4.

18. Слитый белок на основе ферментов по п. 17, где шарнирная область области Fc IgG4 заменена на шарнирную область IgG1.

19. Слитый белок на основе ферментов по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

20. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения лизосомальной болезни накопления (LSD), содержащая слитый белок на основе ферментов по любому из пп. 1-19.

21. Фармацевтическая композиция по п. 20, где лизосомальная болезнь накопления (LSD) выбрана из группы, состоящей из мукополисахаридоза (MPS), болезни накопления гликогена, сфинголипидоза, болезни Ниманна-Пика, болезни Фабри, болезни Гоше, синдрома Хантера и синдрома Марото-Лами.

22. Фармацевтическая композиция по п. 20, где композиция снижает аффинность связывания фермента в отношении лизосомальных рецепторов.

23. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок на основе ферментов по любому из пп. 1-19.

24. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 23.

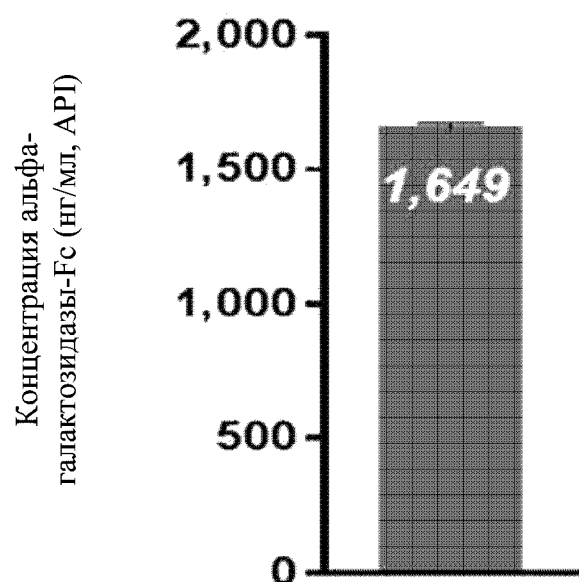
25. Трансформант, в который введен экспрессионный вектор по п. 24.

26. Способ получения слитого белка на основе ферментов, включающий:

(а) выращивание трансформанта по п. 25 с получением культуры; и

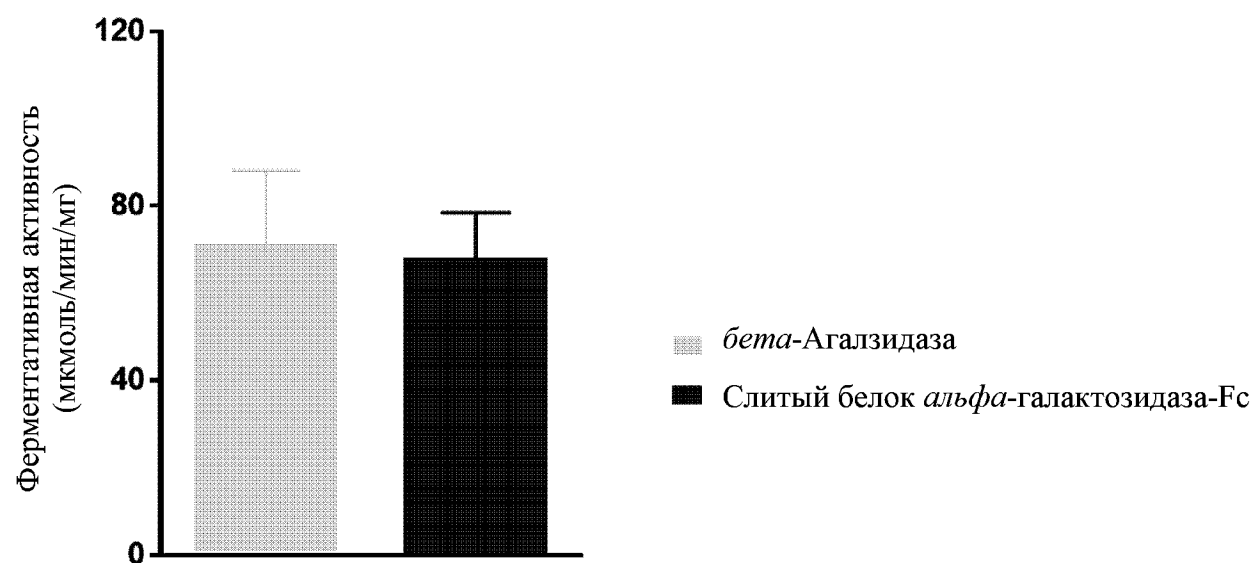
(б) выделение слитого белка на основе ферментов из культуры.

Фиг. 1



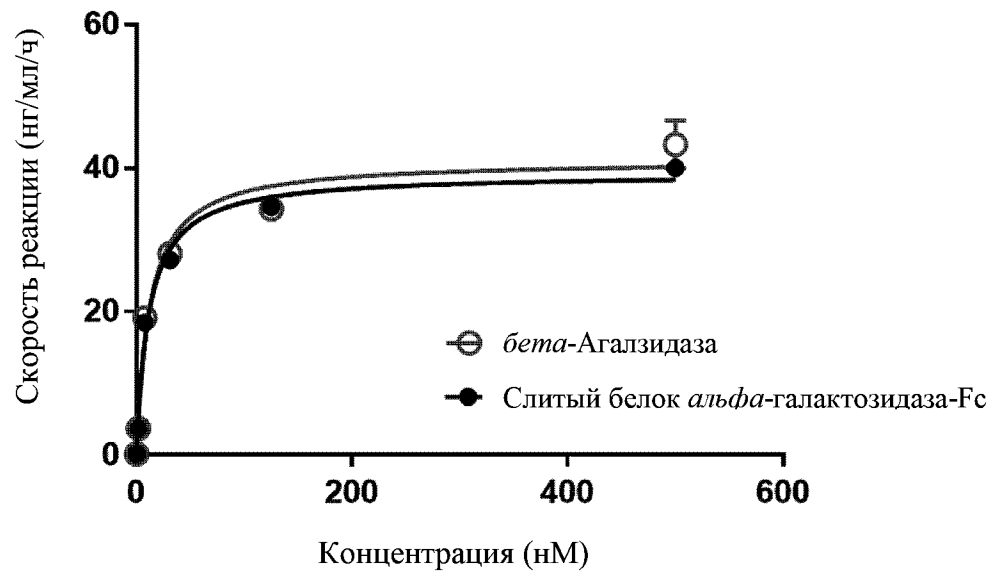
Фиг. 2

Ферментативная активность *бета*-агалзидазы и
слитого белка *альфа*-галактозидаза-Fc

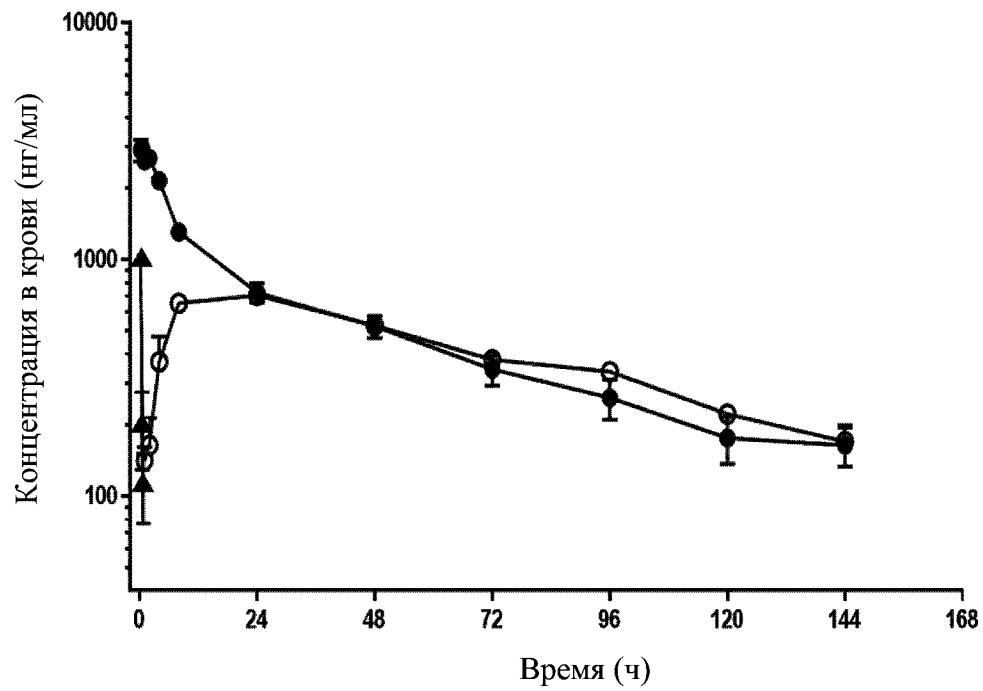


Фиг. 3

Внутриклеточная абсорбционная активность *бета*-агалтидазы и слитого белка *альфа*-галактозидаза-Fc



Фиг. 4



▲ бета-Агалзидаза, 1,0 мг/кг, в.в.

● Слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, 1,0 мг/кг, в.в. (как бета-агалзидаза)

○ Слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, 1,0 мг/кг, п.к. (как бета-агалзидаза)