

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045359**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.17

(21) Номер заявки
202090084

(22) Дата подачи заявки
2018.07.09

(51) Int. Cl. **C12N 9/16** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) **НОВЫЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТНЫЙ СЛИТЫЙ БЕЛОК И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **10-2017-0086594**

(32) **2017.07.07**

(33) **KR**

(43) **2020.06.19**

(86) **PCT/KR2018/007754**

(87) **WO 2019/009684 2019.01.10**

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

(72) Изобретатель:
**Хо Ён Хо, Ким Джин Ён, Чой Ин Юнг,
Чун Сун Юб (KR)**

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

(56) **WO-A1-2015009052
JP-A-2004525621
WO-A1-2014193173
WO-A2-2017100467
KR-A-1020150136514
KR-A-1020170091056**

(57) Изобретение относится к слитому белку, содержащему терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина, к способу его получения и к композиции, содержащей такой слитый белок.

B1

045359

045359

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к терапевтическому слитому ферментному белку, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с ферментом с целью увеличения *in vivo* времени полужизни терапевтических ферментов, к способу их получения и к композиции, содержащей их.

Предшествующий уровень техники

Лизосомы представляют собой цитоплазматические органеллы, которые обеспечивают разрушение макромолекул, таких как белки, полинуклеотиды, полисахариды и липиды. Внутренняя среда лизосом является кислой и в ней содержатся ферменты гидролазы, которые способствуют гидролизу биологических макромолекул. Также обнаружено, что лизосомы играют определенную роль в абсорбции молекул посредством внутриклеточного эндоцитоза.

Лизосомные болезни накопления (ниже LSD) представляют собой наследственные метаболические нарушения, характеризующиеся потерей лизосомных функций. LSD вызваны дефицитом ферментов, разрушающих такие вещества, как липиды, белки, полисахариды, и т.д., и они обычно встречаются с частотой 1 на 100000 и наследуются как аутосомно-рецессивные признаки. LSD возникают, когда имеется дефицит или отсутствие специфических разлагающих ферментов, а когда эти разлагающие ферменты находятся в дефиците, получаемый избыток веществ без разложения накапливается, в конечном счете вызывая проблемы в функциях клеток. Как и многие другие генетические нарушения, LSD наследуются от родителей. Кроме того, каждое из этих заболеваний возникает в результате мутации в любом из генов, которые соответственно вовлечены в трансляцию разных ферментов. Ферменты, вызывающие эти заболевания, обычно имеют похожие биохимические свойства и все LSD вызваны аномальным накоплением веществ в лизосомах. В настоящее время известно примерно 50 разных типов LSD (например болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Хантера, синдром Марото-Лами и др.). Типичным способом лечения этих LSD может быть заместительная ферментная терапия (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).

Синдром Хантера, являющийся представителем LSD, представляет собой заболевание, вызванное дефицитом идуранат-2-сульфатазы (IDS), при котором гликозаминогликан (GAG) не разрушается из-за дефицита идуранат-2-сульфатазы и накапливается в лизосомах. Симптомы синдрома Хантера включают характерную грубость черт лица, большую голову, увеличенный размер живота из-за гепатомегалии и спленомегалии и т.д., и он также сопровождается потерей слуха, заболеванием сердечного клапана, obstructивным респираторным заболеванием, апноэ во сне и т.д. Известно, что синдром Хантера встречается с частотой 1 на 162000 и наследуется как X-связанная рецессивная форма, ассоциированная с X-хромосомой. Элапраза® (рекомбинантная IDS, Shire Pharmaceuticals Group) в настоящее время используется в качестве заместительной ферментной терапии для лечения синдрома Хантера.

Как правило, белки, такие как терапевтические ферменты, имеют низкую стабильность и, таким образом, легко денатурируются и разлагаются протеазами в крови. Поэтому для поддержания концентрации и активности этих белков в крови необходимо их частое введение пациентам. Однако в случае белковых препаратов, вводимых пациентам в форме инъекций, частые инъекции для поддержания концентрации активных полипептидов в крови могут вызывать значительную боль у пациента. Для решения этих проблем прилагались постоянные усилия по максимизации фармакологической эффективности путем повышения стабильности терапевтических ферментов в крови и поддержания их концентрации в крови на высоком уровне в течение более длительного периода времени. Такие длительно действующие композиции терапевтических ферментов требуются для повышения стабильности терапевтических ферментов и для одновременного поддержания активности самих лекарственных средств на достаточно высоком уровне, а также для того, чтобы не вызывать иммунной реакции у пациентов.

В частности, LSD представляют собой фатальную патологию, вызванную генетическими дефектами в конкретных ферментах, которая может привести к смерти, и заместительная терапия имеет большое значение для лечения дефицита ферментов. Заместительная ферментная терапия является стандартной терапией в случае LSD, и лечение облегчает существующие симптомы или задерживает развитие заболевания путем замены дефицитного фермента. Однако из-за необходимости непрерывного внутривенного введения лекарственного средства один раз в одну или две недели в течение 2-6 ч повседневная жизнь пациентов и членов их семей может быть ограничена.

Поскольку время полужизни рекомбинантных ферментов, используемых для лечения LSD у человека, очень короткое, в диапазоне от 10 мин до менее 3 ч, и рекомбинантные ферменты должны вводиться до конца жизни, это является неудобным для пациентов. Соответственно, существует высокая потребность в продлении времени полужизни рекомбинантных ферментов.

Для стабилизации белков и предотвращения их удаления почками, в настоящее время активно изучают слитые белки с использованием Fc-участка иммуноглобулина.

Имуноглобулины являются основными составляющими крови, и существует пять разных типов иммуноглобулинов (т.е. IgG, IgM, IgA, IgD и IgE). Наиболее часто используемым типом в исследованиях слитого белка является IgG, и он подразделяется на четыре субтипа (IgG1~IgG4). Слитые белки, полученные с использованием Fc иммуноглобулина, могут иметь увеличенный размер, что предотвращает их

удаление почками, и также связываются с рецепторами FcRn и, таким образом, играют роль в увеличении времени полужизни в крови в результате эндоцитоза и рециклинга в клетках.

Однако Fc-участок иммуноглобулина имеет недостаток, заключающийся в том, что она может вызывать нежелательный иммунный ответ, тем самым осуществляя эффекторные функции, такие как анти-телозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Эти функции возникают в результате связывания Fc-участка иммуноглобулина с Fc-рецептором или комплементом, или гликозилирования Fc-участка. Кроме того, очень вероятно, что *in vivo* возможна нестабильность самого Fc.

Следовательно, имеется недостаток, заключающийся в том, что активность слитого белка не сохраняется, в то время как продолжительность времени жизни желательного слитого белка одновременно стабильно увеличивается *in vivo*.

Раскрытие

Техническая задача

Целью настоящего изобретения является предложение ферментного слитого белка, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом, так что терапевтический фермент имеет увеличенную продолжительность времени полужизни *in vivo* по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина.

Другой целью настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции, содержащей терапевтический ферментный слитый белок.

Еще одной целью настоящего изобретения является предложение полинуклеотида, кодирующего терапевтический ферментный слитый белок, экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, и трансформанта, в который введен экспрессионный вектор.

Еще одной целью настоящего изобретения является предложение способа получения ферментного слитого белка, включающего культивирование трансформанта.

Техническое решение

Одним из аспектов настоящего изобретения является предложение ферментного слитого белка, в котором слиты терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к ферментному слитому белку, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом, так что терапевтический фермент имеет увеличенную продолжительность времени полужизни *in vivo* по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина.

Следующее ниже соответствует еще одному воплощению настоящего изобретения.

В частности, в качестве ферментного слитого белка согласно любому из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что фермент выбран из группы, состоящей из: бета-глюкозидазы, альфа-галактозидазы, бета-галактозидазы, идуронидазы, идуронат-2-сульфатазы, галактоза-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, лизосомной кислой липазы, альфа-N-ацетил-глюкозаминидазы, глюкocereброзидазы, бутирилхолинэстеразы, хитиназы, глутаматдекарбоксилазы, имиглюцеразы, липазы, уриказы, ацетилгидролазы тромбоцит-активирующего фактора, нейтральной эндопептидазы и миелопероксидазы.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина в слитом белке-ферменте слиты посредством пептидного линкера.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок молекулы иммуноглобулина и димерный терапевтический фермент слиты.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина имеет вариацию, выбранную из группы, состоящей из замещения, добавления, делеции, модификации по меньшей мере одной аминокислоты Fc-участка нативного иммуноглобулина и их комбинации.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что в Fc-участке иммуноглобулина, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 2-ая аминокислота заменена пролином; 71-ая аминокислота заменена глутамином; или 2-ая аминокислота заменена пролином и 71-ая аминокислота заменена глутамином.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что в Fc-участке иммуноглобулина не происходит обмена цепей.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что он обладает повышенной стабильностью и пониженной аффинностью связывания с лизосомными рецепторами, таким образом, имеет высокую сте-

пень распределения в тканях по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина выбран 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; (д) комбинации одного, двух или более доменов, выбранных из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина или части шарнирной области; и (е) димера, образованного каждым из доменов константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина имеет по меньшей мере одну характеристику, выбранную из группы, состоящей из (а) удаление участка, способного образовать дисульфидную связь, (б) удаление определенного аминокислотного остатка на N-конце нативного Fc, (в) добавление остатка метионина к N-концу нативного Fc, (г) удаление сайта связывания с комплементом или (д) удаление сайта антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина агликозилирован.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина представляет собой фрагмент Fc, происходящий из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, имеющих разное происхождение, происходящих из иммуноглобулинов, выбранных из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что Fc-участок иммуноглобулина представляет собой Fc-участок IgG4.

В качестве ферментного слитого белка в соответствии с любым из предыдущих конкретных воплощений, ферментный слитый белок характеризуется тем, что шарнирная область Fc-участка иммуноглобулина IgG4 заменена на шарнирную область IgG1.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен фармацевтическая композиция для профилактики или лечения лизосомной болезни накопления (LSD).

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения LSD, содержащей ферментный слитый белок.

В качестве композиции по любому из предыдущих конкретных воплощений, композиция отличается тем, что 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.

В качестве композиции по любому из предыдущих конкретных воплощений, композиция отличается тем, что фермент представляет собой идуонат-2-сульфатазу (IDS) или арилсульфатазу В (ARSB).

В качестве композиции по любому из предыдущих конкретных воплощений, композиция характеризуется тем, что она уменьшает аффинность связывания терапевтического фермента с лизосомными рецепторами.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий ферментный слитый белок.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен экспрессионный вектор, содержащий такой полинуклеотид.

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

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения ферментного слитого белка.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения ферментного слитого белка, который включает культивирование трансформанта с получением культуры; и выделение ферментного слитого белка из культуры.

Полезные эффекты изобретения

Настоящее изобретение относится к терапевтическому ферментному слитому белку длительного действия и, в частности, к ферментному слитому белку, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом, так что терапевтический фермент обладает повышенной стабильностью и механизм удаления фермента почками ослаблен. Ферментный слитый белок по настоящему изобретению может эффективно использоваться пациентами вследствие увеличения продолжительности его времени

полужизни.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана диаграмма, подтверждающая экспрессию слитого белка IDS-Fc.

На фиг. 2 показана диаграмма, подтверждающая экспрессию слитого белка ARSB-Fc.

На фиг. 3 показан график, подтверждающий результаты фармакокинетических экспериментов со слитым белком IDS-Fc по настоящему изобретению.

На фиг. 4 показан график, подтверждающий результаты фармакокинетических экспериментов со слитым белком ARSB-Fc по настоящему изобретению.

На фиг. 5 показана диаграмма, подтверждающая *in vitro* ферментативную активность слитого белка IDS-Fc по настоящему изобретению.

На фиг. 6 показана диаграмма, подтверждающая *in vitro* ферментативную активность слитого белка ARSB-Fc по настоящему изобретению.

На фиг. 7 показан график, иллюстрирующий результаты измерений уровней гликозаминогликана (GAG) в моче после внутривенной или подкожной инъекции слитого белка IDS-Fc по настоящему изобретению мыши с нокаутом IDS.

На фиг. 8 показана диаграмма, иллюстрирующая результаты измерений уровней гликозаминогликана (GAG) в ткани после внутривенной или подкожной инъекции слитого белка IDS-Fc по настоящему изобретению мыши с нокаутом IDS.

На фиг. 9 показана диаграмма, подтверждающая степень распределения в тканях слитого белка ARSB-Fc по настоящему изобретению.

Подробное описание изобретения

Ниже подробно описаны типичные воплощения настоящего изобретения. При этом каждое из пояснений и типичных воплощений, раскрытых здесь, может быть применено к другим пояснениям и типичным воплощениям. То есть все комбинации различных факторов, раскрытых здесь, входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретным описанием, представленным ниже.

Кроме того, специалисты в данной области техники смогут распознавать или подтвердить, на основании рутинных экспериментов, множество эквивалентов для конкретных воплощений настоящего изобретения, описанных в этом изобретении, и подразумевается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

На протяжении всего описания используются не только обычные однобуквенные или трехбуквенные коды для встречающихся в природе аминокислот, но также трехбуквенные коды, обычно разрешенные для других аминокислот, такие как α -аминоизомасляная кислота (Aib), Sar (N-метилглицин), α -метил-глутаминовая кислота и т.д. Кроме того, аминокислоты, указанные в сокращениях в данном описании изобретения, описаны в соответствии с правилами IUPAC-IUB 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 ферментный слитый белок, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом, так что терапевтический фермент имеет увеличенное время полужизни *in vivo* по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым Fc-участок иммуноглобулина не слит.

В настоящем изобретении ферментный слитый белок может представлять собой такой белок, в котором Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом, так что терапевтический фермент может сохранять свою активность, в то время как его аффинность связывания с лизосомными рецепторами уменьшается по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина, тем самым увеличивая его время полужизни в крови.

Авторы настоящего изобретения получили слитый белок с Fc-участком иммуноглобулина для увеличения времени полужизни в крови терапевтических ферментов. В частности, в качестве Fc-участка использовали Fc-аналог IgG4, в котором потенциальная последовательность гликозилирования замещена, чтобы ингибировать гликозилирование и дополнительно замещена шарнирная последовательность Fc

IgG4, чтобы ингибировать обмен цепей. В результате авторы настоящего изобретения подтвердили, что терапевтический ферментный слитый белок, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, имеет значительно увеличенное время полужизни в крови и способен сохранять активность, аналогичную активности известных ферментов, таким образом, обеспечивая новую форму структуры слитого белка, в которой слиты терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина.

Терапевтический фермент для включения в ферментный слитый белок по настоящему изобретению может включать любой терапевтический фермент, который может иметь преимущество увеличенной времени полужизни *in vivo* по сравнению с типом терапевтического фермента, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина, но терапевтический фермент только этим не ограничивается. В типичном воплощении настоящего изобретения ферментный слитый белок представляет собой слитый белок терапевтического фермента.

Кроме того, ферментный слитый белок по настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства для заместительной ферментной терапии (ERT). Заместительная ферментная терапия может предупреждать или лечить заболевание путем восстановления функции поврежденного фермента путем дополнения дефектного или дефицитного фермента, вызывающего заболевание.

В конкретном воплощении терапевтический фермент может представлять собой терапевтический фермент, выбранный из группы, состоящей из бета-глюкозидазы, альфа-галактозидазы, бета-галактозидазы, идуридазы, идуридат-2-сульфатазы, галактоза-6-сульфатазы, кислой альфа-глюкозидазы, кислой церамидазы, кислой сфингомиелиназы, галактоцереброзидазы, арилсульфатазы А, В, бета-гексозаминазы А, В, гепарин N-сульфатазы, альфа-D-маннозидазы, бета-глюкуронидазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, лизосомной кислой липазы, альфа-N-ацетил-глюкозаминидазы, глюкоцереброзидазы, бутирилхолинэстеразы, хитиназы, глутаматдекарбоксилазы, имиглуцеразы, липазы, уриказы, ацетилгидролазы тромбоцит-активирующего фактора, нейтральной эндопептидазы и миелопероксидазы, но любой терапевтический фермент, оказывающий терапевтическое действие на заболевания, может быть включен в настоящее изобретение независимо от его происхождения или типа.

В настоящем изобретении термин "ферментный слитый белок" может быть использован взаимозаменяемо с "ферментным слитым белком длительного действия".

При использовании здесь, термин "терапевтический фермент" относится к ферменту для лечения заболеваний, которые возникают из-за отсутствия, недостатка, нарушения функционирования и т.д., и фермент может лечить субъекта с такими заболеваниями с помощью заместительной ферментной терапии, введения и т.д. В частности, фермент может представлять собой фермент для лечения LSD, которые могут быть вызваны отсутствием, дефицитом и т.д. лизосомного фермента, но фермент этим не ограничивается.

В частности, терапевтический фермент по настоящему изобретению может представлять собой арилсульфатазу В (ARSB) или идуридат-2-сульфатазу, но не ограничен ими, при условии, что он представляет собой фермент, оказывающий терапевтическое действие на целевые заболевания.

При использовании здесь, термин "арилсульфатаза В (ARSB)" относится к арилсульфатазе, которая присутствует в лизосомах печени, поджелудочной железы и почек, и фермент участвует в гидролизе сульфатов путем разложения гликозаминогликана. Известно, что арилсульфатаза В ассоциирована с мукополисахаридозом VI (синдром Марото-Лами). В настоящем изобретении термин арилсульфатаза В может быть использован взаимозаменяемо с галсульфазой. В частности, арилсульфатаза В может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, которую может кодировать полинуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 3, но арилсульфатаза В не ограничена ею.

При использовании здесь, термин "идуридат-2-сульфатаза" представляет собой сульфатазу, ассоциированную с синдромом Хантера (MPS-II) и является ферментом существенным для лизосомной деградации гепаринсульфата и дерматансульфата. В настоящем изобретении термин идуридат-2-сульфатаза может быть использован взаимозаменяемо с идурсульфазой. Идурсульфатаза может представлять собой идурсульфазу-альфа или идурсульфазу-бета, но идурсульфатаза не ограничена ими. В частности, идуридат-2-сульфатаза может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, которая может быть кодирована полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, но идуридат-2-сульфатаза не ограничена ими.

Терапевтический фермент может быть получен или изготовлен известным в данной области способом и, в частности, фермент может быть очищен из культуры после культивирования животных клеток, в которые введен экспрессионный вектор животных, или может быть использован после приобретения имеющихся в продаже ферментов, но фермент не ограничен ими.

Ферментные слитые белки по настоящему изобретению могут находиться в форме, где один или два фермента связаны с одной молекулой Fc-участка, имеющей две цепи иммуноглобулина в димерной форме, но ферментные слитые белки не ограничены ими. В частности, ферментные слитые белки по настоящему изобретению могут находиться в форме, где мономерный Fc-участок и фермент слиты и экспрессируются, и затем две мономерных Fc-участка образуют одну молекулу димерного Fc-участка через дисульфидную связь, и каждый из двух ферментов связан с каждой из двух Fc-областей, но ферментные слитые белки не ограничены ими. Ферменты могут быть связаны друг с другом через ковалентную или

нековалентную связь или могут быть независимыми друг от друга, но ферментные слитые белки не ограничены ими.

В частности, в одном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что ферментный слитый белок длительного действия, в котором слиты димер идуронат-2-сульфатазы или арилсульфатазы В и одна молекула Fc-участка, демонстрирует более высокую ферментативную активность *in vitro* по сравнению с ферментом, с которым Fc-участок не слит, и было подтверждено, что это обусловлено структурными характеристиками ферментных слитых белков, которые включают димер терапевтических ферментов (пример 5).

Кроме того, в другом аспекте ферментный слитый белок по настоящему изобретению может быть белком, где Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом через пептидный линкер.

Пептидный линкер может включать одну или более аминокислот, например от 1 до 1000 аминокислот, но пептидный линкер конкретно не ограничен этим. В настоящем изобретении любой известный пептидный линкер (например, включающий линкер [GS]_x, линкер [GGGS]_x и линкер [GGGS]_x и т.д., в котором x представляет собой натуральное число 1 или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) и, более конкретно, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 6, но пептидные линкеры не ограничены ими.

В рамках настоящего изобретения положение, в котором пептидный линкер слит с терапевтическим ферментом и Fc-участком иммуноглобулина, не ограничен при условии, что пептидный линкер может связывать терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина с сохранением активности терапевтического фермента, в частности оба конца терапевтического фермента и Fc-участка иммуноглобулина, и более конкретно С-конца терапевтического фермента и N-конца Fc-участка иммуноглобулина, но положение не ограничено ими.

Используемые здесь термины "N-конец" и "С-конец" относятся к аминоконцу и к карбоксильному концу белка соответственно. Например, "N-конец" или "С-конец" могут включать не только самый концевой аминокислотный остаток N-конца или С-конца, но также аминокислотные остатки, соседние с аминокислотным остатком N-конца или С-конца, и, в частности, с 1-ого аминокислотного остатка до 20-ого аминокислотного остатка от самого конца, но N-конец или С-конец этим не ограничены.

В одном воплощении настоящего изобретения слитые белки (SEQ ID NO: 23 или 25), в которых N-конец IgG4 слит с С-концом терапевтического фермента, были получены с использованием терапевтического фермента и линкера (SEQ ID NO: 6)-IgG4 посредством ПЦП с перекрывающимися праймерами, и была подтверждена экспрессия слитых белков (примеры 1-3).

Терапевтический фермент, включенный в ферментный слитый белок по настоящему изобретению, может быть природного типа, и фрагмент, состоящий из части терапевтического фермента или аналога терапевтического фермента, в котором имели место изменения, выбранные из группы, состоящей из замены, добавления, удаления и модификации некоторых аминокислот и их комбинации, может быть включен в настоящее изобретение без ограничения, при условии, что он имеет активность, эквивалентную активности естественно встречающегося типа терапевтического фермента.

Кроме того, аналог терапевтического фермента включает все те ферменты, у которых одна или более аминокислот добавлены к амино- и/или карбокси-концам природного терапевтического фермента.

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

При использовании здесь, термин "фрагмент" относится к форме, где удалены одна или более аминокислот в амино- или карбоксильном конце нативного терапевтического фермента или аналога нативного терапевтического фермента. Нативный терапевтический фермент или его аналог входят в объем настоящего изобретения независимо от размера фрагмента или вида аминокислот, если они обладают активностью терапевтического фермента.

Аналоги терапевтического фермента могут включать биосимиляры и биобеттеры соответствующих терапевтических ферментов. Например, в отношении биосимиляров, учитывая различие в хозяине для их экспрессии по сравнению с известным терапевтическим ферментом, различие в гликозилировании и его степени, и различие в степени замещения конкретного аминокислотного остатка соответствующего фермента в свете стандартной последовательности, где степень замещения не равна 100% замещению, они принадлежат к биоподобным ферментам для использования в качестве ферментного слитого белка по настоящему изобретению. Терапевтические ферменты могут быть получены известными в данной области способами, в частности посредством генетической рекомбинации в животных клетках, клетках *E.coli*, дрожжей, клетках насекомых, клетках растений, живых животных и т.д., и способ получения не ограничен ими, и имеющиеся в продаже ферменты могут быть приобретены и использованы, но ферменты не ограничены ими.

Кроме того, терапевтические ферменты могут включать аминокислотную последовательность, которая имеет гомологию по меньшей мере 80%, более конкретно 90%, и еще более конкретно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% или более с вышеуказанными ферментами и их аналогами, и терапевтические ферменты могут быть получены из микроорганизмов посредством рекомбинантной технологии или являться имеющимися в продаже, но терапевтические ферменты не ограничены ими.

При использовании здесь, термин "гомология" представляет степень сходства с аминокислотной последовательностью дикого типа или нуклеотидной последовательностью дикого типа, и гомологичное сравнение может быть выполнено невооруженным глазом или с использованием программы сравнения, которую можно легко приобрести. Гомологию двух или более последовательностей можно рассчитать в процентах (%) с помощью коммерческой компьютерной программы. Гомология (%) может быть рассчитана для соседних последовательностей.

Информация о последовательностях терапевтических ферментов или их аналогов и о нуклеотидных последовательностях, кодирующих их, может быть получена из известной базы данных (например NCBI, и т.д.).

При использовании здесь, термин "Fc-участок иммуноглобулина" относится к участку молекулы иммуноглобулина, включающему константную область тяжелой цепи 2 (CH2) и/или константную область тяжелой цепи 3 (CH3), исключая переменные области тяжелой и легкой цепей. Применительно к настоящему изобретению, такой Fc-участок иммуноглобулина может включать модифицированную шарнирную область в константной области тяжелой цепи, но не ограничен этим.

Такой Fc-участок иммуноглобулина может включать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, но не ограничен этим. Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой расширенный Fc-участок, включающий часть или всю константную область тяжелой цепи 1 (CH1) и/или константную область легкой цепи 1 (CL1), исключая переменные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при условии, что Fc-участок иммуноглобулина оказывает эффект, аналогичный или эквивалентный эффекту Fc-участка нативного типа. Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой удалена часть достаточно длинной аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен Fc-участок иммуноглобулина, который может быть выбран из группы, состоящей из 1) домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4; 2) домена CH1 и домена CH2; 3) домена CH1 и домена CH3; 4) домена CH2 и домена CH3; 5) комбинации одного, или двух, или более доменов, выбранных из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина (или части шарнирной области); и 6) димера каждого домена константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи, но Fc-участок иммуноглобулина не ограничен этим.

При использовании здесь, термин "обмен цепей" относится к проблеме, заключающейся в том, что, когда Fc IgG4 используют в качестве носителя слитого белка, Fc IgG4 образует гибриды с IgG4, присутствующим *in vivo*, или присутствует в виде мономера и изменяет исходную структуру с получением структуры с низкой терапевтической активностью; ранее сообщалось, что существует значительная сложность при использовании для терапевтических целей слитого белка, где белок является слитым (van der Neut Kolfshoten, et al., Science, 317:1554 to 1557. 2007).

В настоящем изобретении авторы настоящего изобретения предприняли усилия для решения вышеуказанной проблемы путем замены последовательности шарнирной области в Fc-участке иммуноглобулина. В частности, Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может быть таким, в котором высокоактивная последовательность гликозилирования замещена с целью регулирования гликозилирования, или замещена последовательность, участвующая в обмене цепей, или может соответствовать обоим случаям.

В конкретном воплощении Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может быть таким, в котором 2-ая аминокислота и/или 71-ая аминокислота Fc-участка иммуноглобулина SEQ ID NO: 8 заменена другой аминокислотой для предупреждения обмена цепей и N-гликозилирования. Более конкретно, Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может быть 1) таким, в котором 2-ая аминокислота (т.е. серин) заменена пролином, 2) таким, в котором 71-ая аминокислота (т.е. аспарагин) заменена глутамином, но Fc-участок иммуноглобулина не ограничен ими. Кроме изменений, описанных выше, Fc-участок иммуноглобулина может включать подходящее изменение в качестве носителя лекарственного средства для увеличения стабильности терапевтического фермента.

В частности, Fc-участок иммуноглобулина может быть таким, в котором шарнирная область Fc IgG4 заменена шарнирной областью IgG1, но Fc-участок иммуноглобулина не ограничен этим.

В одном воплощении настоящего изобретения 2-ая аминокислота Fc-участка иммуноглобулина SEQ ID NO: 8 заменена на пролин и 71-ая аминокислота Fc-участка иммуноглобулина SEQ ID NO: 8 заменена на глутамин и, таким образом, уменьшен обмен цепей и N-гликозилирование. Последовательность полученного Fc-участка иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (пример 1).

В одном воплощении шарнирная область может быть такой, в которой часть последовательности шарнирной области, имеющей следующую аминокислотную последовательность, удалена или модифицирована.

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 26)

В частности, шарнирная область может иметь изменение, когда часть шарнирной области удалена, так чтобы включать только один остаток цистеина (Cys); или может быть такой, где остаток серина (Ser), вовлеченный в обмен цепей, заменен остатком пролина (Pro) и, в частности, такой, где 2-ой серин последовательности шарнирной области заменен остатком пролина, но шарнирная область не ограничена ими.

В настоящем изобретении Fc-участок иммуноглобулина может повышать стабильность слитого терапевтического фермента, при этом предотвращая обмен цепей и образование мономеров в Fc-участке, путем включения шарнирной области в ее нативной форме или модифицированной шарнирной области.

Кроме того, в другом конкретном воплощении Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению не только включает нативные аминокислотные последовательности, но также аналоги этих последовательностей. Аминокислотный аналог означает, что изменение, выбранное из группы, состоящей из замены, добавления, удаления, модификации и их комбинации, произошло по меньшей мере в одном аминокислотном остатке нативной аминокислотной последовательности.

Например, аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331 в IgG Fc, которые, как известно, являются важными для связывания, можно использовать в качестве участков, подходящих для изменения. Кроме того, возможны различные типы аналогов, например аналог, где удален сайт, способный образовывать дисульфидную связь, аналог, где удалены несколько N-концевых аминокислот из нативного Fc, аналог, где остаток метионина добавлен к N-концу нативного Fc, и т.д. Кроме того, комплемент-связывающие сайты (например, C1q-связывающие сайты) или сайты антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) могут быть удалены для удаления эффекторной функции. Методики получения аналогов последовательности Fc-участка иммуноглобулина раскрыты в международных публикациях WO 97/34631, WO 96/32478 и т.д.

Аминокислотные замещения в молекуле белка или пептида, которые не меняют всей активности молекулы, хорошо известны в данной области (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее распространенные замещения 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 аминокислоты могут быть модифицированы посредством фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнесилирования, ацетилирования, амидирования и т.д.

Кроме того, вышеописанные аналоги Fc могут быть такими, которые проявляют такую же биологическую активность, как активность Fc-участка по настоящему изобретению, и имеют повышенную структурную стабильность Fc-участка в отношении тепла, pH и т.д.

Кроме того, такой Fc-участок может быть получен из нативного типа, выделенного из людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и т.д., или могут быть их рекомбинантами или аналогами, полученными из трансформированных животных клеток или микроорганизмов. Здесь они могут быть получены из нативного Fc путем выделения целых иммуноглобулинов из организмов человека или животных и обработки их протеазой. Папаин расщепляет нативный Fc-участок на Fab- и Fc- участки, и обработка пепсином приводит к получению фрагментов rF'c и F(ab)₂. Эти фрагменты могут быть подвергнуты гель-фильтрации для выделения Fc или rF'c. В более конкретном воплощении Fc-участок может представлять собой рекомбинантный Fc-участок иммуноглобулина, полученный из микроорганизма, представляющий собой Fc-участок, происходящий из человека.

Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина может находиться в форме нативного гликана, увеличенных или уменьшенных гликанов, по сравнению с его нативным типом, или в дегликозилированной форме. Увеличение, уменьшение или удаление Fc-гликанов иммуноглобулина может быть достигнуто обычными способами, такими как химический способ, ферментативный способ и способ генной инженерии с использованием микроорганизма. В частности, Fc-участок иммуноглобулина, где гликаны удалены из Fc-участка, демонстрирует значительное снижение аффинности связывания с комплементом (C1q) и уменьшение или удаление антителозависимой цитотоксичности или комплемент-зависимой цитотоксичности и, таким образом, он не индуцирует ненужные иммунные ответы *in vivo*. В связи с этим, Fc-участок иммуноглобулина в дегликозилированном или агликозилированном Fc-участке иммуноглобулина может быть более подходящей формой, соответствующей исходной задаче настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

При использовании здесь, термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных остатков из Fc-участка, а термин "агликозилирование" относится к негликозилированному Fc-участку, продуцируемому в прокариотах, более конкретно *E.coli*.

В то же время Fc-участок иммуноглобулина может происходить из человека или животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, и наиболее конкретно, он может происходить из людей.

Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина может представлять собой Fc-участок, происходящий из

IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, или их комбинацию или их гибрид. В более конкретном воплощении он может происходить из IgG или IgM, которые относятся к наиболее часто встречающимся белкам в крови человека, и в еще более конкретном воплощении он может происходить из IgG, который, как известно, увеличивает время полужизни лиганд-связывающих белков. В более конкретном воплощении Fc-участок иммуноглобулина может представлять собой Fc-участок IgG4, в еще более конкретном воплощении он может представлять собой гликозилированный Fc-участок, происходящий из человеческого IgG4, и в наиболее конкретном воплощении Fc-участок иммуноглобулина может представлять собой Fc-участок IgG4, который включает изменение, где 2-ая аминокислота аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 Fc-участка иммуноглобулина заменена пролином и/или 71-ая аминокислота заменена глутамином; или аминокислотная последовательность Fc-участка иммуноглобулина представляет собой SEQ ID NO: 9 и полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность, представляет собой SEQ ID NO: 7, но Fc-участок иммуноглобулина не ограничен ими.

При использовании здесь, термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие Fc-участки одноцепочечного иммуноглобулина одного и того же происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Таким образом, димер или мультимер может быть получен из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE Fc.

Кроме того, белки по настоящему изобретению могут быть белками, в которых N-конец и/или C-конец белков не модифицирован(ы), но для повышения стабильности терапевтических ферментов и защиты от ферментов расщепления белка *in vivo*, эти белки, в которых N-конец и/или C-конец терапевтических ферментов химически модифицированы или защищены органической группой, или аминоконцев терапевтических ферментов модифицирован посредством добавления аминокислоты и т.д., также включены в объем белков согласно настоящему изобретению. Когда C-конец терапевтических ферментов не модифицирован, концы белков согласно настоящему изобретению могут иметь карбоксильные концы, но белки по настоящему изобретению не ограничены ими.

В частности, поскольку N-конец и C-конец химически синтезированных белков имеют заряды, N-конец может быть ацетилирован и/или C-конец может быть амидирован, чтобы удалить этих заряды, но способы конкретно не ограничены этим.

Если иное не указано в настоящем описании, методики в отношении "фермента" или "слитого белка" согласно настоящему изобретению, описанные в подробном описании изобретения или формуле изобретения настоящего изобретения, применяются не только к рассматриваемому ферменту или слитому белку, но также и ко всему объему, включающему все соли рассматриваемого фермента или слитого белка (например, фармацевтически приемлемую соль слитого белка) или его сольват. Соответственно, хотя в описании изобретения он просто описано как "фермент" или "слитый белок", описание объекта будет также применено к конкретной соли, конкретному сольвату и конкретному сольвату конкретной соли. Такие солевые формы могут находиться в форме, например, использующей любую фармацевтически приемлемую соль, но тип соли конкретно не ограничен. Такие солевые формы, например, могут представлять собой солевые формы, которые безопасны и эффективны для млекопитающих, но солевые формы конкретно ими не ограничены.

При использовании здесь, термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое может быть эффективно использовано для предполагаемого применения, не вызывая чрезмерной токсичности, стимуляции или аллергических реакций, и т.д. в пределах медико-фармацевтического заключения.

При использовании здесь, термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, происходящую из фармацевтически приемлемых неорганических солей, органических солей или оснований. Примеры подходящих солей могут включать соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-п-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и т.д. Примеры солей, происходящих из подходящих оснований, могут включать щелочные металлы, такие как натрий, калий и т.д., щелочноземельные металлы, такие как магний, аммоний и т.д.

Кроме того, при использовании здесь, термин "сольват" относится к комплексу, образуемому ферментом, слитым белком по настоящему изобретению или его солью и молекулой растворителя.

Ферментный слитый белок по настоящему изобретению может быть получен известным в данной области способом.

В одном воплощении настоящего изобретения получали рекомбинантный вектор, где каждый из ферментов идуронат-2-сульфатазы (IDS) и арилсульфатазы B (ARSB) (т.е. терапевтические ферменты) могут экспрессироваться в форме, слитой с пептидным линкером- Fc иммуноглобулина, и эти терапевтические ферменты получали посредством экспрессии их в клеточной линии CHO (клетки яичника китайского хомячка) (примеры 1-3).

Однако ферментный слитый белок по настоящему изобретению может быть получен методами, отличными от описанных в вышеприведенных воплощениях. Ферментный слитый белок может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или 25, но аминокислотные последовательности не ограничены ими.

Ферментный слитый белок по настоящему изобретению может увеличить время полужизни терапевтического фермента, который оказывает терапевтическое действие на LSD при сохранении активности терапевтического фермента, посредством слияния терапевтического фермента с Fc-участком иммуноглобулина. В частности, терапевтический фермент, слитый с модифицированным Fc-участком иммуноглобулина, имеет пониженные обмен цепей и гликозилирование и, таким образом, может иметь более низкую аффинность связывания с лизосомными рецепторами по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым Fc-участок не слит и, таким образом, может иметь большой период существования, подтверждая, что такой терапевтический фермент эффективен для лечения LSD.

В одном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что ферментный слитый белок по настоящему изобретению может поддерживать ферментативную активность *in vitro* (пример 5), обладая при этом значимо превосходящим временем полужизни ($T_{1/2}$), максимальной концентрацией лекарственного средства в крови (C_{max}), и доступностью *in vivo* (AUC) (пример 4) по сравнению с природным ферментом, с которым Fc-участок не слит, и из этих результатов было подтверждено, что лекарственное средство может быть использовано даже в низких дозах по сравнению с обычными лекарственными средствами (пример 6).

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения лизосомных болезней накопления (LSD), содержащая ферментный слитый белок, который получен в соответствии со способом получения ферментного слитого белка, или ферментный слитый белок.

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

В конкретном воплощении ферментный слитый белок фармацевтической композиции по настоящему изобретению может представлять собой белок, где идуронат-2-сульфатаза (IDS) или арилсульфатаза В (ARSB) слита с Fc-участком иммуноглобулина, но ферментный слитый белок не ограничен ими.

При использовании здесь, термин "лизосома", являясь одной из органелл, присутствующих в цитоплазме, содержит много гидролаз и, таким образом, разлагает нежелательные вещества в организме, такие как макромолекулы, бактерии, и т.д., и помогает разлагаемым продуктам быть использованными в других частях клеток. Функции лизосомы могут быть выполнены многими ферментами. Когда конкретный фермент теряет свою функцию из-за мутации, дефекта и т.д., это вызывает потерю функции разложения у лизосомы и приводит к накоплению макромолекул и т.д., которые должны разлагаться, в клетках и вызывает повреждение клеток и т.д., тем самым вызывая заболевание.

При использовании здесь, термин "лизосомная болезнь накопления (LSD)" относится к редкому генетическому заболеванию, вызванному потерей лизосомных функций, описанных выше, и заместительная ферментная терапия, использующая дефектный белок, является важной. В соответствии с дефектным ферментом, LSD может включать мукополисахаридоз (MPS), болезнь накопления гликогена, сфинголипидоз, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Хантера, синдром Марото-Лами и т.д.

Ниже LSD будет подробно описана в соответствии с ее классификацией.

При использовании здесь, термин "синдром Марото-Лами", который относится к заболеванию мукополисахаридозу VI типа (MPS), представляет собой аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, возникающее из-за дефицита арилсульфатазы В (N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы), необходимой для разрушения гликозаминогликана. Синдром Марото-Лами является заболеванием, возникающим при накопления дерматансульфата, который не был разрушен из-за дефицита фермента, в костях, сердечных клапанах, селезенке, печени, роговице и т.д.

При использовании здесь, термин "арилсульфатаза В (ARSB)" относится к арилсульфатазе, которая присутствует в лизосомах печени, поджелудочной железы и почек, и этот фермент выполняет роль гидролиза сульфатов путем разложения гликозаминогликана. Известно, что арилсульфатаза В ассоциирована с мукополисахаридозом VI (синдромом Марото-Лами). В настоящем изобретении термин арилсульфатаза В может быть использован взаимозаменяемо с галсульфазой.

При использовании здесь, термин "синдром Хантера (болезнь Хантера)" представляет собой X-сцепленное рецессивное генетическое заболевание, возникающее из-за дефицита идуронат-2-сульфатазы (IDS), и известно, что гепарансульфат и дерматансульфат накапливаются из-за дефицита фермента. Симптомы синдрома Хантера включают ухудшение функций, прогрессирующую потерю слуха, пигментный ретинит, папиллоэдему, гидроцефалию и т.д. В настоящем изобретении термин "мукополисахаридоз II" может быть использован взаимозаменяемо с "синдромом Хантера".

При использовании здесь, термин "идуронат-2-сульфатаза", который представляет собой фермент сульфатазу, связанный с синдромом Хантера (MPS-II), является ферментом, необходимым для лизосомной деградации гепаринсульфата и дерматансульфата. В настоящем изобретении термин "идуронат-2-

сульфатаза" может быть использован взаимозаменяемо с "идурсульфазой". Идурсульфазы могут представлять собой, например, идурсульфазу-альфа или идурсульфазу-бета, но идурсульфазы не ограничены ими.

Терапевтический фермент может быть получен или изготовлен способом, известным в данной области и, в частности, фермент может быть очищен из культуры после культивирования животных клеток, в которые введен экспрессионный вектор животных, или может быть использован после приобретения имеющихся в продаже ферментов, но фермент не ограничен ими.

Ферментный слитый белок, содержащийся в композиции по настоящему изобретению, может увеличить время полужизни терапевтического фермента, оказывающего терапевтическое действие на LSD, при сохранении активности терапевтического фермента в результате слияния терапевтического фермента с Fc-участком иммуноглобулина. В частности, терапевтический фермент, слитый с модифицированной Fc-участком иммуноглобулина, имеет пониженный обмен цепей и пониженное гликозилирование и, таким образом, может иметь более низкую аффинность связывания с лизосомными рецепторами по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc, и, таким образом, может иметь больший период существования, подтверждая, что такой терапевтический фермент является эффективным для лечения LSD.

В одном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что ферментный слитый белок по настоящему изобретению, даже при более низкой частоте введения по сравнению с частотой введения фермента, с которым Fc-участок не слит, уменьшает гликозаминогликановый (GAG) показатель у IDS-нокаутных мышей (пример 6).

Кроме того, в другом воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что ферментный слитый белок по настоящему изобретению не только демонстрирует высокую степень распределения в костном мозге и селезенке по сравнению с нативным ферментом, с которым не слит Fc-участок, но также показывает его распределение в легких, почках, сердце и т.д., в то время как распределение нативного фермента не было подтверждено в тканях субъекта (пример 7).

Эти результаты свидетельствуют, что ферментный слитый белок по настоящему изобретению, при введении на основе высокой стабильности, может не только улучшить соблюдение пациентом схемы лечения за счет снижения частоты введения, но также может обеспечить возможность подкожного введения благодаря его высокой степени распределения в тканях.

При использовании здесь, термин "предупреждение" относится ко всем активностям, которые ингибируют или замедляют возникновение LSD в результате введения ферментного слитого белка или композиции, содержащей ферментный слитый белок, и термин "лечение" относится ко всем активностям, которые улучшают или предпочтительно изменяют симптомы LSD в результате введения ферментного слитого белка или композиции, содержащей ферментный слитый белок.

При использовании здесь, термин "введение" относится к введению конкретного вещества пациенту любым подходящим способом, и путь введения композиции может представлять собой любой традиционный путь, который обеспечивает доставку композиции к мишени *in vivo*, например внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, внутривенное введение, внутривенное введение и т.д. Однако, поскольку пептиды перевариваются при пероральном введении, активные ингредиенты композиции для перорального введения предпочтительно покрывают оболочкой или готовят в виде композиции с целью защиты от разрушения в желудке и, в частности, могут быть введены в инъекционной форме. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с использованием определенного устройства, способного транспортировать активные ингредиенты в целевую клетку.

Общую эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в виде одной дозы или можно вводить в течение длительного периода времени в виде нескольких доз в соответствии с протоколом фракционного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного ингредиента может варьироваться в зависимости от тяжести заболевания. В частности, общая суточная доза слитого белка по настоящему изобретению может составлять от примерно 0,0001 мг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Однако эффективную дозу слитого белка определяют с учетом различных факторов, включая возраст пациента, массу тела, состояние здоровья, пол, тяжесть заболевания, диету, скорость экскреции и т.д. в дополнение к пути введения и частоте применения фармацевтической композиции. В связи с этим специалисты в данной области могут легко определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению конкретно не ограничена составом, путем введения и способом, при условии, что она демонстрирует эффекты согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении фактическая доза ферментного слитого белка может быть определена на основании типов терапевтического фермента, используемого в качестве активного ингредиента, наряду с различными факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст, пол и вес пациента, тяжесть заболевания и т.д. Поскольку ферментный слитый белок по настоящему изобретению

имеет значительно улучшенные период существования и активность *in vivo*, доза, число введений и частота введения фармацевтической композиции, содержащей ферментный слитый белок по настоящему изобретению, могут быть существенно уменьшены.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или растворитель. Фармацевтически приемлемый носитель может быть неприродного происхождения.

При использовании здесь, термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам обладания количеством, достаточным для проявления терапевтического эффекта и не вызывающим неблагоприятных эффектов, и может быть легко определено специалистами в данной области на основе факторов, хорошо известных в медицинской области, таких как вид заболевания, возраст, масса, состояние здоровья, пол, чувствительность пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное(ые) средство(а), подлежащее смешиванию или одновременному введению, и т.д.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать, для перорального введения, связывающее вещество, смазывающее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, ароматизатор, и т.д.; для инъекций, буферный агент, консервант, анальгетик, солюбилизующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент, и т.д., которые могут быть объединены для использования; и для местного введения, основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант, и т.д., но фармацевтически приемлемые носители не ограничиваются ими.

Тип композиции по настоящему изобретению может быть получен различными способами путем комбинирования с вышеописанным фармацевтически приемлемым носителем. Например, для перорального введения, композиция может быть приготовлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, лепешек и т.д. Для инъекций, композиция может быть приготовлена в виде ампул с единичной дозой или контейнеров с несколькими дозами. Кроме того, композиция может быть также приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, композиций с замедленным высвобождением, и т.д.

Между тем 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.д. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, увлажнитель, ароматизатор, консервант и т.д.

Кроме того, ферментный слитый белок может быть использован посредством смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, одобренными для фармацевтических лекарственных средств, такими как физиологический раствор или органические растворители. Для повышения стабильности или абсорбционной способности в качестве фармацевтических средств можно использовать углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстрины, и антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы.

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

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий ферментный слитый белок по настоящему изобретению.

Полинуклеотид, кодирующий ферментный слитый белок по настоящему изобретению, может представлять собой полинуклеотид в форме, где область, кодирующая терапевтический фермент, и область, кодирующая пептидный линкер-Fc-участок иммуноглобулина, соединены и, в частности, полинуклеотид, кодирующий слитый белок, где N-конец Fc-участка иммуноглобулина соединен с C-концом терапевтического фермента посредством линкера GGGGS, но полинуклеотид не ограничен ими. Более конкретно, полинуклеотид по настоящему изобретению может включать последовательность SEQ ID NO: 1 или 3, но последовательность не ограничена этим, при условии, что полинуклеотид может кодировать слитый белок, содержащий терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид.

При использовании здесь, термин "рекомбинантный вектор" относится к ДНК-конструкции, где целевой пептид (например, ферментный слитый белок) функционально связан с подходящей контрольной последовательностью для обеспечения экспрессии целевого пептида (например ферментного слитого белка) в подходящем хозяине. Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может быть сконструирован как вектор для типичного клонирования или как вектор 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

соответствующий мРНК-связывающий домен рибосомы, и последовательность, контролирующую окончание транскрипции и трансляции. Рекombинантный вектор после трансформации подходящей клетки-хозяина может реплицироваться или функционировать независимо от генома хозяина, или может быть интегрирован в сам геном-хозяина.

Рекombинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, может не быть конкретно ограничен, при условии, что вектор способен реплицироваться в клетке-хозяине и может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области. Примеры вектора могут включать природные или рекombинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Вектор, который можно использовать в настоящем изобретении, конкретно не ограничен и может быть использован любой известной экспрессионный вектор.

Рекombинантный вектор используют для трансформации клетки-хозяина для получения ферментного слитого белка по настоящему изобретению. Кроме того, эти трансформированные клетки, как часть настоящего изобретения, можно использовать для амплификации нуклеиновокислотных фрагментов и векторов, или они могут представлять собой культивированные клетки или клеточные линии, используемыми в рекombинантном продуцировании ферментного слитого белка по настоящему изобретению.

При использовании здесь термин "трансформация" относится к способу введения рекombинантного вектора, включающего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку-хозяина, тем самым обеспечивая экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом, в клетке-хозяине. Для трансформирующего полинуклеотида не имеет значения, введен он в хромосому клетки-хозяина и находится в ней или находится вне хромосомы, при условии, что он может экспрессироваться в этой клетке-хозяине, и включены оба случая.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид может быть введен 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 генную конструкцию, содержащую все существенные элементы, необходимые для самоэкспрессии. Экспрессионная кассета обычно может включать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, сигнал окончания транскрипции, рибосомо-связывающий домен и сигнал окончания трансляции. Экспрессионная кассета может находиться в форме экспрессионного вектора, способного к самоэкспрессии. Кроме того, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина как есть и функционально связан с последовательностью, существенной для его экспрессии в клетке-хозяине, но полинуклеотид не ограничен этим.

Кроме того, при использовании здесь, термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между промоторной последовательностью, которая инициирует и опосредует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего целевой пептид по настоящему изобретению, и вышеуказанной последовательностью генов.

Подходящий хозяин для использования в настоящем изобретении может не быть конкретно ограничен, при условии, что он может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры подходящего хозяина могут включать бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как *E.coli*; бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, принадлежащие 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 животные клетки, такие как CHO, COS, BSC, и т.д.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен трансформанта, в который введен экспрессионный вектор.

Применительно к настоящему изобретению, трансформант, в который введен экспрессионный вектор по настоящему изобретению, может не быть ограничен, при условии, что этот трансформант может экспрессировать и продуцировать ферментный слитый белок, но трансформант может представлять собой бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как *E.coli*; бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, принадлежащие 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.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения ферментного слитого белка по настоящему изобретению.

В частности, способ может включать:

- (а) культивирование трансформанта с получения культуры; и
- (б) выделение ферментного слитого белка из этой культуры, но способ не ограничен этим.

В настоящем изобретении среда, используемая в культивировании трансформанта, должна соответствовать требованиям к культивированию клеток-хозяев надлежащим образом. Источники углерода, которые могут содержаться в среде для роста клетки-хозяина, могут быть соответствующим образом выбраны специалистом в данной области в соответствии с типом полученного трансформанта, и подходящие условия культивирования могут быть подобраны так, чтобы контролировать период и величину культивирования.

Примеры источников сахара, используемых 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 можно использовать по отдельности или в комбинации.

Примеры используемого источника азота могут включать пептон, дрожжевой экстракт, мясной соус, солодовый экстракт, кукурузный экстракт, соевую муку и мочевины, или неорганические соединения, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония. Источники азота также можно использовать по отдельности или в комбинации.

Примеры используемых источников 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, необходимую для роста.

Наконец, можно использовать важные для роста вещества, такие как аминокислоты и витамины. Кроме того, также можно использовать соответствующие предшественники культуральной среды. Указанные выше источники могут быть подходящим образом добавлены в культуру во время культивирования посредством периодической культуры или непрерывной культуры. Значение pH культуры можно соответствующим образом отрегулировать, используя щелочное соединение, такое как гидроксид натрия, гидроксид калия и аммиак, или кислотное соединение, такое как фосфорная кислота или серная кислота. Кроме того, для предупреждения образования пены может быть добавлен пеногаситель, такой как сложный полиглицоловый эфир жирной кислоты. Помимо этого, для поддержания аэробного состояния культуры, в культуру можно вводить кислород или кислородсодержащий газ (например, воздух).

Трансформант по настоящему изобретению можно культивировать при 20-45°C, и более конкретно при 25-40°C. Кроме того, культивирование продолжают вплоть до получения максимальной величины продуцирования необходимого ферментного слитого белка, и с этой целью культивирование обычно может продолжаться в течение 10-160 ч.

Как описано выше, трансформант по настоящему изобретению может продуцировать ферментный слитый белок, когда обеспечены соответствующие условия культивирования для клетки-хозяина, и ферментный слитый белок, продуцируемый в соответствии со структурой вектора и характеристиками клетки-хозяина, может секретироваться в цитоплазму, или в периплазматическое пространство клетки-хозяина, или внеклеточно.

Белки, экспрессируемые в клетке-хозяине или вне ее, могут быть очищены обычным способом. Примеры способа очистки могут включать высаливание (например, осаждение сульфатом аммония, осаждение фосфатом натрия и т.д.), осаждение растворителем (например, осаждение белковой фракции с использованием ацетона или этанола, и т.д.), диализ, гель-фильтрацию, ионный обмен или хроматографию, такую как колоночная хроматография с обращенными фазами, ультрафильтрацию и т.д., и эти способы можно использовать по отдельности или в комбинации.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения LSD у субъекта, включающий введение ферментного слитого белка или композиции, содержащей ферментный слитый белок.

Поскольку ферментный слитый белок по настоящему изобретению содержит терапевтический фермент, который может предупреждать или лечить LSD, субъекта с подозрением на наличие LSD можно подвергнуть профилактике или лечить путем введения ферментного слитого белка, содержащего терапевтический фермент, или фармацевтической композиции, содержащей ферментный слитый белок.

При использовании здесь, термин "субъект" относится к субъекту с подозрением на наличие LSD, с субъектом с подозрением на наличие LSD относится к млекопитающим, включающим людей, крыс, крупный рогатый скот и т.д., у которых имеется LSD или существует риск развития LSD, но любой субъект, которого можно лечить с помощью ферментного слитого белка по настоящему изобретению или композиции, содержащей такой ферментный слитый белок, включен без ограничения.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей ферментный слитый белок. Подходящая общая суточная доза композиции может быть определена в рамках правильного медицинского заключения практикующим врачом, и композицию можно вводить один или несколько раз в виде отдельных доз. Однако, применительно к настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы конкретная терапевтически эффективная доза композиции для любого конкретного пациента применялась по-разному, в зависимости от различных факторов, включающих тип и степень реакции, которые должны быть достигнуты, конкретные композиции, включая случаи эпизодического использования с ними других агентов, возраст пациента, массу, состояние здоровья, пол и диету, время введения, путь введения, скорость выведения композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и аналогичные факторы, хорошо известные в медицинской области.

В то же время способ предупреждения или лечения LSD может представлять собой комбинирован-

ную терапию, которая дополнительно включает введение соединения или вещества, имеющего терапевтический эффект в отношении по меньшей мере одного из LSD, но способ не ограничен этим.

При использовании здесь, термин "комбинация" следует понимать, как относящийся к одновременному, разделному или последовательному введению. Когда введение является последовательным или разделным, интервал, допустимый для введения второго ингредиента, должен быть таким, при котором не должны теряться преимущества комбинации.

Доза введения ферментного слитого белка, имеющего терапевтическую активность в отношении LSD, может составлять примерно от 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента, но доза конкретно не ограничена.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложено применение ферментного слитого белка или композиции, содержащей ферментный слитый белок, в получении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения LSD.

Ниже настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Однако эти примеры предназначены только для иллюстративных целей, и объем изобретения не ограничен этими примерами.

Пример 1. Получение экспрессионного вектора для слитого белка.

Для получения ферментных слитых белков получали экспрессионный вектор для слитых белков посредством ПЦП с перекрывающимися праймерами с использованием экспрессионного вектора (IDS cDNA, каталожный номер EX-C0003-M02, Genescopeia; ARSB cDNA, каталожный номер EX-C0073-M02, Genescopeia), в который введены природные идуронат-2-сульфатаза (IDS, SEQ ID NO: 1) и арилсульфатаза В (ARSB, SEQ ID NO: 3), соответственно, синтезированный линкер (SEQ ID NO: 5) и Fc-участок иммуноглобулина IgG4 (SEQ ID NO: 7). Поскольку техника перекрывающейся ПЦП включает последовательности, которые перекрываются с праймерами при амплификации каждого фермента и линкера-Fc, получаемые продукты ПЦП будут включать перекрывающиеся последовательности. Для амплификации слитого белка, ПЦП выполняли следующим образом: 1) первичная ПЦП (25 циклов, состоящих из 95°C в течение 1 мин; 57°C в течение 30 с; и 68°C в течение 3 мин) и 2) вторичная ПЦП (25 циклов, состоящих из 95°C в течение 1 мин; 57°C в течение 30 с; и 68°C в течение 4 мин).

В частности, для IDS, ПЦП выполняли с использованием праймеров SEQ ID NO: 10 и 11; и для линкер-Fc, ПЦП выполняли с использованием праймеров SEQ ID NO: 12 и 13. В результате ПЦП-продукт IDS включал последовательность линкер-Fc на 3'-конце и ПЦП-продукт линкер-Fc включал последовательность IDS на 5'-конце.

Вторичную ПЦП выполняли с использованием двух ПЦП-продуктов, полученных в результате первичной ПЦП в качестве матриц вместе с праймерами (SEQ ID NO: 10 и 13) и затем получали ПЦП-продукт, имеющий последовательность IDS-Fc. Перекрывающуюся последовательность в продукте, имеющем последовательность IDS-Fc, переваривали рестрикционными ферментами (KpnI и XhoI) и полученный ПЦП-продукт вводили в вектор X0GC с получением экспрессионного вектора (pX0GC-Enzyme-Fc).

Таким же образом получали ПЦП-продукт, имеющий последовательность ARSB-Fc, с использованием праймеров (SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17). Полученный ПЦП-продукт переваривали рестрикционными ферментами (KpnI и XhoI) и вводили в вектор X0GC, который уже был переварен теми же рестрикционными ферментами (KpnI и XhoI), с получением экспрессионного вектора для слитых белков.

Таблица 1

Праймер перекрывающейся ПЦР

	Последовательность	SEQ ID NO
IDS-F (<i>KpnI</i>)	5'-CAGGTACCATGCCGCCACCCCGGACC-3'	10
IDS-R (перекрывание)	5'- TGAACCGCCTCCACCAGGCATCAACAACCTGGAAAAGATC TCCAC-3'	11
L15Fc (IDS)-F	5'-CAGTTGTTGATGCCTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCG-3'	12
L15Fc-R (<i>XhoI</i>)	5'-GACTCGAGTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG-3'	13
ARSB-F (<i>KpnI</i>)	5'-CAGGTACCATGGGTCCGCGCGGCGCG-3'	14
ARSB-R (перекрывание)	5'-TGAACCGCCTCCACCCATCCAAGGGCCCCACACCC-3'	15
L15Fc(ARSB)-F	5'-TGGGGCCCTTGGATGGGTGGAGGCGGTTTCAGGCG-3'	16
L15Fc-R (<i>XhoI</i>)	5'-GACTCGAGTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG-3'	17

Сайт обмена цепей и N-гликозилирования в Fc-участке последовательностей полученных слитых белков удаляли с помощью ПЦР метода сайт-направленного мутагенеза.

В частности, 2-ую аминокислоту Fc-участка (т.е. серин), вовлеченную в обмен цепей, заменяли пролином с использованием праймеров (SEQ ID NO: 18 и 19), и 71-ую аминокислоту Fc-участка (т.е. аспарагин), вовлеченную в N-гликозилирование, заменяли глутамином. В последовательностях белка, показанных в табл. 3 ниже, каждая из букв, выделенных жирным шрифтом, указывает на то, что данная аминокислота была заменена, а буквы, которые выделены курсивом, указывают линкеры.

Таблица 2

Праймер для мутагенеза

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO
Fc(S2P)_F	5'- CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCCAGCACCTGAGT TCCT-3'	18
Fc(S2P)_R	5'- AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCG CCAG-3'	19
Fc(N71Q)_F	5'- AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTGG TCAG-3'	20
Fc(N71Q)_R	5'- CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAAGTCTCCTCCCGCG GCT-3'	21

Экспрессионные векторы для ферментных слитых белков, полученные в вышеприведенных примерах, были названы вектор IDS-Fc и вектор ARSB-Fc, соответственно. В качестве альтернативы, эти векторы можно использовать взаимозаменяемо с pXOGC-Enzyme-Fc.

Таблица 3

ДНК-последовательность и белковая последовательность ферментного слитого белка

Название	Последовательность	SEQ ID NO
IDS-Fc	ДНК ATGCCGCCACCCCGGACCGGCCGAGGCCCTTCTCTG GCTGGGTCTG GTTCTGAGCT CCGTCTGCGT	22

CGCCCTCGGA	TCCGAAACGC	AGGCCAACTC
GACCACAGAT	GCTCTGAACG	TTCTTCTCAT
CATCGTGGAT	GACCTGCGCC	CCTCCCTGGG
CTGTTATGGG	GATAAGCTGG	TGAGGTCCCC
AAATATTGAC	CAACTGGCAT	CCCACAGCCT
CCTCTTCCAG	AATGCCTTTG	CGCAGCAAGC
AGTGTGCGCC	CCGAGCCGCG	TTTCTTTCT
CACTGGCAGG	AGACCTGACA	CCACCCGCCT
GTACGACTTC	AACTCCTACT	GGAGGGTGCA
CGCTGGAAAC	TTCTCCACCA	TCCCCCAGTA
CTTCAAGGAG	AATGGCTATG	TGACCATGTC
GGTGGGAAAA	GTCTTTCACC	CTGGGATATC
TTCTAACCAT	ACCGATGATT	CTCCGTATAG
CTGGTCTTTT	CCACCTTATC	ATCCTTCTC
TGAGAAGTAT	GAAAACACTA	AGACATGTGCG
AGGGCCAGAT	GGAGAACTCC	ATGCCAACCT
GCTTTGCCCT	GTGGATGTGC	TGGATGTTCC
CGAGGGCACC	TTGCCTGACA	AACAGAGCAC
TGAGCAAGCC	ATACAGTTGT	TGGAAAAGAT
GAAAACGTCA	GCCAGTCCTT	TCTTCCTGGC
CGTTGGGTAT	CATAAGCCAC	ACATCCCCTT
CAGATACCCC	AAGGAATTC	AGAAGTTGTA
TCCCTTGGAG	AACATCACCC	TGGCCCCCGA
TCCCGAGGTC	CCTGATGGCC	TACCCCTGT
GGCCTACAAC	CCCTGGATGG	ACATCAGGCA
ACGGGAAGAC	GTCCAAGCCT	TAAACATCAG
TGTGCCGTAT	GGTCCAATTC	CTGTGGACTT
TCAGCGGAAA	ATCCGCCAGA	GCTACTTTGC
CTCTGTGTCA	TATTTGGATA	CACAGGTCGG
CCGCCTCTTG	AGTGCTTTGG	ACGATCTTCA
GCTGGCCAAC	AGCACCATCA	TTGCATTTAC
CTCGGATCAT	GGGTGGGCTC	TAGGTGAACA
TGGAGAATGG	GCCAAATACA	GCAATTTTGA
TGTTGCTACC	CATGTTCCCC	TGATATTCTA

TGTTCTGGA	AGGACGGCTT	CACTTCCGGA
GGCAGGCGAG	AAGCTTTTCC	CTTACCTCGA
CCCTTTTGAT	TCCGCCTCAC	AGTTGATGGA
GCCAGGCAGG	CAATCCATGG	ACCTTGTGGA
ACTTGTGTCT	CTTTTTCCCA	CGCTGGCTGG
ACTTGCAGGA	CTGCAGGTTC	CACCTCGCTG
CCCCGTTCT	TCATTTACG	TTGAGCTGTG
CAGAGAAGGC	AAGAACCTTC	TGAAGCATTT
TCGATTCCGT	GACTTGGAAG	AGGATCCGTA
CCTCCCTGGT	AATCCCCGTG	AACTGATTGC
CTATAGCCAG	TATCCCCGGC	CTTCAGACAT
CCCTCAGTGG	AATTCTGACA	AGCCGAGTTT
AAAAGATATA	AAGATCATGG	GCTATTCCAT
ACGCACCATA	GACTATAGGT	ATACTGTGTG
GGTTGGCTTC	AATCCTGATG	AATTTCTAGC
TAACTTTTCT	GACATCCATG	CAGGGGAACT
GTATTTTGTG	GATTCTGACC	CATTGCAGGA
TCACAATATG	TATAATGATT	CCCAAGGTGG
AGATCTTTTC	CAGTTGTTGA	TGCCTGGTGG
<i>AGGCGGTCA</i>	<i>GGCGGAGGTG</i>	<i>GCTCTGGCGG</i>
<i>TGGCGGATCG</i>	CCATCATGCC	CAGCACCTGA
GTTCTGGGG	GGACCATCAG	TCTTCTGTT
CCCCCAAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT
CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT
GGTGGACGTG	AGCCAGGAAG	ACCCTGAGGT
CCAGTTCAAC	TGGTACGTGG	ACGGCGTGGA
GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA
GGAGCAGTTC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC	ACCAGGACTG
GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT
CTCCAACAAA	GGCCTCCCAT	CCTCCATCGA
GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC
CCGAGAACCA	CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC
ATCCCAGGAG	GAGATGACCA	AGAACCAGGT

		CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	
		TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	
		CAATGGGCAG	CCGGAGAACA	ACTACAAGAC	
		CACGCCTCCC	GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	
		CTTCTTCCTC	TACAGCAGGC	TAACCGTGGA	
		CAAGAGCAGG	TGGCAGGAGG	GGAACGTCTT	
		CTCATGCTCC	GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	
		CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT	
		GTCTCTGGGT	AAATGA		
	Белок	MPPPR	TGRGLLWLGL	VLSSVCVALG	SETQANSTTD
		ALNVLLIIVD	DLRPSLGCYG	DKLVRSPNID	
		QLASHSLLFQ	NAFAQQAVCA	PSRVSFLTGR	
		RPDTTRLYDF	NSYWRVHAGN	FSTIPQYFKE	
		NGYVTMSVGK	VFHPGISSNH	TDDSPYSWSF	
		PPYHPSSEKY	ENTKTCRGPD	GELHANLLCP	
		VDVLDVPEGT	LPDKQSTEQA	IQLLEKMKTS	
		ASPFFLAVGY	HKPHIPFRYP	KEFQKLYPLE	
		NITLAPDPEV	PDGLPPVAYN	PWMDIRQRED	
		VQALNISVPY	GPIPVDFQRK	IRQSYFASVS	
		YLDTQVGRLL	SALDDLQLAN	STIIAFTSDH	
		GWALGEHGEW	AKYSNFDVAT	HVPLIFYVPG	
		RTASLPEAGE	KLFPYLDPFD	SASQLMEPGR	23
		QSMDLVELVS	LFPTLAGLAG	LQVPPRCVPV	
		SFHVELCREG	KNLLKHFRFR	DLEEDPYLPG	
		NPRELIAYSQ	YPRPSDIPQW	NSDKPSLKDI	KIMGYSIRTI
		DYRYTVWVGF	NPDEFLANFS	DIHAGELYFV	
		DSDPLQDHNM	YNDSQGGDLF	QLLMPGGGGS	
		<i>GGGSGGGGS</i>	PPCPAPEFLG	GPSVFLFPPK	
		PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SQEDPEVQFN	
		WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	QSTYRVVSVL	
		TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPSSIEKTI	
		SKAKGQPREP	QVYTLPPSQE	EMTKNQVSLT	
		CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPP	
		VLDSGDSFFL	YSRLTVDKSR	WQEGNVFSCS	

		VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K			
ARSB- Fc	ДНК	ATGGGTCC	GCGCGGCGCG	GCGAGCTTGC	24
		CCCCGAGGCC	CGGTCCTCGG	CGGCTGCTTC	
		TCCCCGTCGT	CCTCCGCTG	CTGCTGCTGC	
		TGTTGTTGGC	GCCGCCGGGC	TCGGGCGCCG	
		GGGCCAGCCG	GCCGCCCCAC	CTGGTCTTCT	
		TGCTGGCAGA	CGACCTAGGC	TGGAACGACG	
		TCGGCTTCCA	CGGCTCCCGC	ATCCGCACGC	
		CGCACCTGGA	CGCGCTGGCG	GCCGGCGGGG	
		TGCTCCTGGA	CAACTACTAC	ACGCAGCCGC	
		TGTGCACGCC	GTCGCGGAGC	CAGCTGCTCA	
		CTGGCCGCTA	CCAGATCCGT	ACAGGTTTAC	
		AGCACCAAAT	AATCTGGCCC	TGTCAGCCCA	
		GCTGTGTTCC	TCTGGATGAA	AAACTCCTGC	
		CCCAGCTCCT	AAAAGAAGCA	GGTTATACTA	
		CCCATATGGT	CGGAAAATGG	CACCTGGGAA	
		TGTACCGGAA	AGAATGCCTT	CCAACCCGCC	
		GAGGATTGA	TACCTACTTT	GGATATCTCC	
		TGGGTAGTGA	AGATTATTAT	TCCCATGAAC	
		GCTGTACATT	AATTGACGCT	CTGAATGTCA	
		CACGATGTGC	TCTTGATTTT	CGAGATGGCG	
		AAGAAGTTGC	AACAGGATAT	AAAAATATGT	
		ATTCAACAAA	CATATTCACC	AAAAGGGCTA	
		TAGCCCTCAT	AACTAACCAT	CCACCAGAGA	
		AGCCTCTGTT	TCTCTACCTT	GCTCTCCAGT	
		CTGTGCATGA	GCCCCTCAG	GTCCCTGAGG	
		AATACTTGAA	GCCATATGAC	TTTATCCAAG	
		ACAAGAACAG	GCATCACTAT	GCAGGAATGG	
		TGTCCCTTAT	GGATGAAGCA	GTAGGAAATG	
		TCACTGCAGC	TTAAAAAGC	AGTGGGCTCT	
		GGAACAACAC	GGTGTTTCATC	TTTTCTACAG	
		ATAACGGAGG	GCAGACTTTG	GCAGGGGGTA	
		ATAACTGGCC	CCTTCGAGGA	AGAAAATGGA	
		GCCTGTGGGA	AGGAGGCGTC	CGAGGGGTGG	

GCTTTGTGGC	AAGCCCCTTG	CTGAAGCAGA
AGGGCGTGAA	GAACCGGGAG	CTCATCCACA
TCTCTGACTG	GCTGCCAACA	CTCGTGAAGC
TGGCCAGGGG	ACACACCAAT	GGCACAAAGC
CTCTGGATGG	CTTCGACGTG	TGGAAAACCA
TCAGTGAAGG	AAGCCCATCC	CCCAGAATTG
AGCTACTGCA	TAATATTGAC	CCGAACTTCG
TGGACTCTTC	ACCGTGTCCC	AGGAACAGCA
TGGCTCCAGC	AAAGGATGAC	TCTTCTCTTC
CAGAATATTC	AGCCTTTAAC	ACATCTGTCC
ATGCTGCAAT	TAGACATGGA	AATTGAAAAC
TCCTCACGGG	CTACCCAGGC	TGTGGTTACT
GGTTCCTCC	ACCGTCTCAA	TACAATGTTT
CTGAGATACC	CTCATCAGAC	CCACCAACCA
AGACCCTCTG	GCTCTTTGAT	ATTGATCGGG
ACCCTGAAGA	AAGACATGAC	CTGTCCAGAG
AATATCCTCA	CATCGTCACA	AAGCTCCTGT
CCCGCCTACA	GTTCTACCAT	AAACTCAG
TCCCCGTGTA	CTTCCCTGCA	CAGGACCCCC
GCTGTGATCC	CAAGGCCACT	GGGGTGTGGG
GCCCTTGGAT	<i>GGGTGGAGGC</i>	<i>GGTTCAGGCG</i>
<i>GAGGTGGCTC</i>	<i>TGGCGGTGGC</i>	<i>GGATCGCCAT</i>
CATGCCCAGC	ACCTGAGTTC	CTGGGGGGAC
CATCAGTCTT	CCTGTTCCCC	CCAAAACCCA
AGGACACCCT	CATGATCTCC	CGGACCCCTG
AGGTCACATG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC
AGGAAGACCC	TGAGGTCCAG	TTCAACTGGT
ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG	CATAATGCCA
AGACAAAGCC	GCGGGAGGAG	CAGTTCAACA
GCACGTACCG	TGTGGTCAGC	GTCCTACCG
TCCTGCACCA	GGACTGGCTG	AATGGCAAGG
AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC
TCCCATCCTC	CATCGAGAAA	ACCATCTCCA
AAGCCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG

	TGTACACCT	GCCCCATCC	CAGGAGGAGA	
	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC	
	TGGTCAAAGG	CTTCTATCCC	AGCGACATCG	
	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT	GGGCAGCCGG	
	AGAACAATA	CAAGACCACG	CCTCCCCTGC	
	TGGACTCCGA	CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	
	GCAGGCTAAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC	
	AGGAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	
	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC	CACTACACGC	
	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CTGGGTAAAT	GA
Белок	MGPRGA	ASLPRGPGPR	RLLLPVVLPL	LLLLLLAPPG
	SGAGASRPPH	LVFLLADDLG	WNDVGFHGSR	
	IRTPHLDALA	AGGVLLDNY	TQPLCTPSRS	
	QLLTGRYQIR	TGLQHIIWP	CQPSCVPLDE	
	KLLPQLLKEA	GYTTHMVGKW	HLGMYRKECL	
	PTRRGFDTYF	GYLLGSEDYY	SHERCTLIDA	
	LVNTRCALDF	RDGEEVATGY	KNMYSTNIFT	
	KRAIALITNH	PPEKPLFLYL	ALQSVHEPLQ	
	VPEEYLKPYD	FIQDKNRHHY	AGMVSLMDEA	
	VGNVTAALKS	SGLWNNTVFI	FSTDNGGQTL	
	AGGNNWPLRG	RKWSLWEGGV	RGVGFVASPL	
	LKQKGVKNRE	LIHISDWLPT	LVKLARGHTN	
	GTKPLDGFVDV	WKTISEGSPS	PRIELLNID	PNFVDSPPC
	RNSMAPAKDD	SSLPEYSAFN	TSVHAAIRHG	
	NWLLTGYPG	CGYWFPPSQ	YNVSEIPSSD	
	PPTKTLWLF	IDRDPEERHD	LSREYPHIVT	
	KLLSRLQFYH	KHSVPVYFPA	QDPRCDPKAT	
	GVGWPWMGGG	GSGGGSGGG	GSPPCPAPEF	
	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	
	DVSQEDPEVQ	FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	
	QFQSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	
	NKGLPSSIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	
	QEEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	
	GQPENNYKTT	PPVLDSDGSF	FLYSRLTVDK	
	SRWQEGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	LGK

Пример 2. Трансформация клеточной линии CHO с использованием экспрессионного вектора для слитого белка.

Рекомбинантный экспрессионный вектор рXOGC-Enzyme-Fc, полученный в примере 1, вводили в клеточную линию DG44/CHO (CHO/dhfr-) (Urlaub et al., Somat. Cell. Mol. Genet., 12, 555 to 566, 1986), в которой поврежден ген DHFR и, таким образом, ее процесс биосинтеза нуклеиновых кислот является несовершенным, с получением трансформанта, и в трансформанте экспрессировали ферментный слитый белок (Enzyme-Fc).

В частности, клеточную линию DG44/CHO культивировали до конfluence, так чтобы клетки покрывали от примерно 80 до примерно 90% дна контейнера, и клетки промывали 3 раза Opti-MEM (Gibco, каталожный номер 51985034).

Между тем, смесь Opti-MEM (3 мл) и рXOGC-Enzyme-Fc (экспрессионный вектор, 5 мкг) и смесь Opti-MEM (3 мл) и липофектамина 2000 (Gibco, каталожный номер 11668-019, 20 мкл) помещали при комнатной температуре на 30 мин. Затем две эти смеси смешивали вместе и к ним добавляли культивированную клеточную линию DG44/CHO и культивировали в условиях 37°C и 5% CO₂ в течение пример-

но 18 ч для введения экспрессионного вектора рXOGC-Enzyme-Fc в клеточную линию DG44/CHO.

Затем культивированные клетки промывали 3 раза средой DMEM-F12, содержащей 10% FBS (Gibco, каталожный номер 11330), среду добавляли к клеткам и снова культивировали в течение 48 ч. Трипсин добавляли к культивируемым клеткам для отделения культивируемых клеток, и эти отделенные клетки инокулировали в селективную среду (среда α -MEM (WELGEN, каталожный номер LM008-02), которая не содержала добавки HT (гипоксантин-тимидин), но содержала 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и 1 мг/мл G418 (Cellgro, каталожный номер 61-234-RG)). Трансформированные клетки отбирали из селективной среды путем культивирования клеток с заменой среды с интервалами 2 суток или 3 суток до тех пор, пока только трансформированные клетки выживали и образовывали колонии. В частности, для повышения уровней экспрессии ферментных слитых белков в отобранных трансформированных клетках, в селективную среду добавляли 10 нМ MTX (метотрексат) (Sigma, каталожный номер M8407) и его концентрации постепенно повышали, таким образом количества MTX в этих трансформированных клетках увеличивались до 20 нМ через одну-две недели.

Пример 3. Подтверждение экспрессии слитых белков IDS-Fc, ARSB-Fc при помощи ELISA (иммуноферментный анализ).

Часть трансформированных клеток, полученных в примере 2, переносили в каждый из флаконов для клеточных культур 175-Т в концентрации 1×10^7 клеток и культивировали, пока клетки почти полностью не покрыли дно контейнера для культивирования, и затем 15 мл бессывороточной среды Ex-cell (приобретенной у Sigma обычным образом, каталожный номер 14360C) с добавлением 1 мМ бутирата натрия (Sigma, каталожный номер B5887) добавляли в каждый флакон и культивировали в инкубаторе (33°C, 5% CO₂) в течение 48 ч. Каждую клеточную культуру переносили в 50 мл пробирку, центрифугировали, и супернатанты снова собирали и измеряли уровни экспрессии слитых белков (IDS-Fc и ARSB-Fc).

Во-первых, определение уровня экспрессии IDS-Fc проводили с использованием непрямого метода ELISA. Человеческие антитела к альфа-TDS (R&D Systems, каталожный номер AF2449), разбавленные в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) до концентрации 1 мкг/мл, добавляли в 96-луночный планшет ELISA (Nunk, каталожный номер 44-2404-21) в количестве 100 мкл/лунка и реакцию проводили в холодильнике (4°C) в течение ночи. На следующие сутки полученный продукт промывали 5 раз буфером PBS-T, и образцы культуры и стандартный продукт IDS (Shire Pharmaceuticals Group, Elaprase®, сер. номер TERE09A17), разбавленные в различных концентрациях, каждый распределяли в количестве 100 мкл/лунка и реакцию проводили при комнатной температуре в течение одного часа. Через один час планшет промывали, и добавляли биотин-меченые человеческие антитела против альфа-IDS (R&D Systems, каталожный номер BAF 2449), и в этой смеси проводили реакцию при комнатной температуре в течение одного часа. Наконец, стрептавидин-HRP (GE Healthcare, каталожный номер RPN440IV) разбавляли в соотношении 1:30000 и разбавленную смесь добавляли в количестве 100 мкл/лунку и реакцию проводили в течение одного часа. Полученный продукт промывали и к нему добавляли раствор субстрата, и реакцию проводили в течение примерно 10 мин. После остановки реакции раствором, останавливающим реакцию, измеряли поглощение полученного продукта при 450 нм. После получения стандартных кривых и функций с использованием концентраций стандартного продукта человеческого IDS и значений абсорбции, определяли количества слитых белков человеческого IDS-Fc. В результате было подтверждено, что слитый белок человеческого IDS-Fc экспрессировался в определенном количестве из выбранных трансформированных клеток (фиг. 1).

Кроме того, уровень экспрессии слитого белка ARSB-Fc измеряли посредством иммуноферментного анализа (Bethyl, каталожный номер E80-104), который может количественно определять человеческий IgG. Антитела к человеческому IgG-Fc (Bethyl, каталожный номер A80-104A-9), разбавленные в концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере (0,05 М карбонат-бикарбонат, pH 9,6), добавляли в 96-луночный планшет ELISA. (Nunk, каталожный номер 44-2404-21) в количестве 100 мкл/лунка и реакцию проводили при комнатной температуре в течение одного часа. Через один час планшет ELISA промывали 5 раз промывочным раствором, и каждый из образцов культуры и стандартного продукта человеческого IgG, включенный в комплект для количественного определения человеческого IgG (Bethyl, каталожный номер RS10-110-4), разбавляли в различных концентрациях и каждый из них распределяли в количестве 100 мкл/лунку и проводили реакцию при комнатной температуре в течение одного часа. Через один час планшет промывали, и HRP-меченые антитела к человеческому IgG-Fc (Bethyl, каталожный номер A80-104P-87), разбавленные в соотношении 1:150000, добавляли в него и проводили реакцию при комнатной температуре в течение одного часа. Наконец, стрептавидин-HRP (GE Healthcare, каталожный номер RPN440IV) разбавляли в соотношении 1:30000 и добавляли в количестве 100 мкл/лунку и затем проводили реакцию в течение одного часа. Полученный продукт промывали, к нему добавляли раствор субстрата и проводили реакцию в течение примерно 15 мин. После остановки реакции раствором, останавливающим реакцию, измеряли поглощение полученного продукта при 450 нм.

После получения стандартных кривых и функций с использованием концентраций стандартного продукта человеческого IgG и значений поглощения, определяли количество слитых белков челове-

ского ARSB-Fc. В результате было подтверждено, что слитый белок человеческого ARSB-Fc экспрессировался в определенном количестве отобранными трансформированными клетками (фиг. 2).

Пример 4. Подтверждение фармакокинетики ферментного слитого белка длительного действия.

Эффекты получения слитых белков сравнивали путем анализа фармакокинетики ферментных слитых белков длительного действия, полученных выше, и фермента, с которым не слит Fc-участок.

Пример 4-1. Эксперимент по фармакокинетики слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия.

Авторы настоящего изобретения попытались подтвердить длительность терапевтического действия слитых белков по настоящему изобретению путем анализа фармакокинетики слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия, полученного в примерах выше.

Для этой цели, идуронат-2-сульфатазу (идурсульфазу, контрольная группа) и слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия (слитый белок IDS-Fc, экспериментальная группа) вводили 3 мышам ICR, соответственно, и сравнивали стабильность в крови и фармакокинетические коэффициенты для коллекций образцов крови согласно каждой группе.

В частности, исходя из концентрации идуронат-2-сульфатазы, белки вводили мышам ICR контрольной группы и экспериментальной группы посредством внутривенных (в/в) и подкожных (п/к) инъекций в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/кг соответственно. Образцы крови отбирали из группы с введенной внутривенной инъекцией через 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч после инъекции, и из группы с введением посредством подкожной инъекции через 0, 1,4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 и 216 ч после инъекции. Количества белков в сыворотке крови измеряли с использованием человеческих специфических антител к идуронат-2-сульфатазе при помощи метода ELISA. Результаты анализов представлены на фиг. 3 и в табл. 4.

Таблица 4

Фармакокинетический профиль	IDS	слитый белок IDS-Fc	
		1,0мг/кг, в/в	1,0мг/кг, п/к
Концентрация введения	0,5мг/кг (в/в)	1,0мг/кг, в/в	1,0мг/кг, п/к
Степень воздействия <i>in vivo</i> (нг/мл*ч)	6047,0	67766,8	43974,4
Максимальная концентрация лекарственного средства в крови (нг/мл)	67670,8	28592,2	687,7
Время полужизни в крови (ч)	4,4	NA	45,3
<i>In vivo</i> биодоступность (%)	-	-	64,9

Как видно из приведенных выше результатов, слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия по настоящему изобретению показал значительно превосходящие фармакокинетические характеристики по сравнению с характеристиками контрольной группы. Эти результаты говорят о том, что преимуществом слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия по настоящему изобретению является уменьшение интервалов между введениями лекарственного средства в фактическом введении лекарственного средства за счет эффекта длительного действия по сравнению с ферментами, которые не являются слитыми белками длительного действия.

Как можно видеть по результатам фармакокинетики, представленным на фиг. 3 и в табл. 4, в случае слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия, увеличивали все показатели из времени полужизни ($T_{1/2}$), максимальной концентрации лекарственного средства в крови (C_{max}) и биодоступности (AUC) *in vivo*. В частности, биодоступность слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия *in vivo* составляла 64,9%, таким образом, была продемонстрирована превосходная биодоступность *in vivo* по сравнению с ферментами, которые не являются слитыми белками длительного действия.

Пример 4-2. Эксперимент по фармакокинетики слитого белка арилсульфатазы В длительного действия.

Авторы настоящего изобретения предприняли попытку проанализировать фармакокинетику слитого белка арилсульфатазы В длительного действия (слитый белок ARSB-Fc), полученного в примерах выше, и таким образом определяли фармакокинетику слитого белка арилсульфатазы В длительного действия и сравнивали результаты с результатами для арилсульфатазы В.

В частности, на основании концентрации арилсульфатазы В, белки вводили мышам ICR контрольной группы (природная арилсульфатаза В: Naglazyme®, BioMarin) и экспериментальной группы (слитый белок арилсульфатазы В длительного действия) посредством внутривенных и подкожных инъекций при концентрации 5,0 мг/кг каждый. Образцы крови собирали из контрольной группы через 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 4; 8 и 24 ч после инъекции, независимо от способа введения. В экспериментальной группе у мышей ICR, которым вводили внутривенные инъекции, образцы крови собирали через 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2;

4; 8; 24, 48, 96 и 168 ч после инъекции, и у мышей, которым вводили подкожные инъекции, образцы крови собирали через 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 24; 48; 96 и 168 ч после инъекции.

Собранные образцы крови в каждой группе центрифугировали и отделяли сыворотку, и количества слитого белка арилсульфатазы В длительного действия и природной арилсульфатазы В в крови определяли посредством метода иммуноферментного анализа, и результаты анализа показаны на фиг. 4 и в табл. 5.

Таблица 5

Фармакокинетический профиль	ARSB	Слитый белок ARSB-Fc	
Введенная концентрация	5,0 мг/кг (в/в)	5,0 мг/кг, в/в	5,0 мг/кг (п/к)
Степень воздействия <i>in vivo</i> (нг/мл * ч)	30776,9	1230279,1	809176,0
Максимальная концентрация лекарственного средства в крови (нг/мл)	241588,2	166838,7	11679,2
Время полужизни в крови (ч)	Нельзя вычислить *	74,2	33,4
Биодоступность <i>in vivo</i> (%)	-	-	65,8
* Нельзя вычислить: $T_{1/2}$ нельзя вычислить из-за чрезвычайно короткого времени полужизни.			

Как видно из приведенных выше результатов, слитый белок арилсульфатазы В длительного действия по настоящему изобретению показал в значительной степени улучшенные фармакокинетические характеристики по сравнению с Naglazyme® (т.е. природной арилсульфатазой В). Эти результаты говорят о том, что слитый белок арилсульфатазы В длительного действия по настоящему изобретению обладает преимуществом уменьшения интервалов введения лекарственного средства при фактическом введении лекарственного средства за счет эффекта длительного действия по сравнению с ферментами.

Как видно из результатов по фармакокинетике, представленных на фиг. 4 и в табл. 5, в случае слитого белка арилсульфатазы В длительного действия увеличиваются все их показатели - время полужизни ($T_{1/2}$), максимальная концентрация лекарственного средства в крови (C_{max}) и биодоступность (AUC) *in vivo*. В частности, биодоступность *in vivo* слитого белка арилсульфатазы В длительного действия составляет 65,8%, таким образом демонстрируя улучшенную биодоступность *in vivo* по сравнению с ферментами, которые не являются слитыми белками длительного действия.

В результате анализа фармакокинетики ферментного слитого белка в примерах 4-1 и 4-2, было подтверждено, что эти ферментные слитые белки демонстрировали значительно увеличенные значения времени полужизни, биодоступности *in vivo*, и т.д. по сравнению с ферментами, с которыми не слит Fc-участок, и, таким образом, можно ожидать длительно действующих эффектов этих ферментных слитых белков.

Пример 5. Подтверждение ферментативной активности ферментного слитого белка длительного действия.

Активности ферментов, включенных в ферментные слитые белки, полученные выше, сравнивали с ферментами, не слитыми с Fc-участком.

Пример 5-1. Ферментативная активность слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия *in vitro*.

Авторы настоящего изобретения предприняли попытку измерить изменения в ферментативной активности в соответствии с препаратом слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия, полученным в примерах выше, и таким образом измеряли ферментативную активность *in vitro*.

Более конкретно, проводили взаимодействие натриевой соли 4-метилумбеллиферила-альфа-L-идопиранозидуроновой кислоты-2-сульфата (4MU- α -IdopurgaA-2), известной как ферментный субстрат, с идуронат-2-сульфатазой и слитым белком идуронат-2-сульфатазы длительного действия при 37°C в течение 4 ч, и затем с альфа-идуронидазой (т.е. ферментом вторичной реакции) при 37°C в течение 24 ч. Затем измеряли флуоресценцию конечного продукта, 4-метилумбеллиферона (4MU) для определения ферментативной активности соответствующего вещества.

В результате было подтверждено, что идуронат-2-сульфатаза и слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия имели ферментативную активность (специфическую активность) $32,0 \pm 1,58$ нмоль/мин/мМ и $87,3 \pm 6,49$ нмоль/мин/мМ, соответственно. Так как слитый белок идуронат-2-

сульфатазы длительного действия имеет структуру, в которой две идуронат-2-сульфатазы связаны с одной молекулой Fc, которая является димерной формой двух Fc-цепей, результат измерений показал, что слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия имеет примерно в 2,7 раза более высокую ферментативную активность *in vitro*, чем идуронат-2-сульфатаза, которая не является слитым белком. Эти результаты свидетельствуют о том, что структурная характеристика слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия, который имеет две идуронат-2-сульфатазы, обладает преимуществом в отношении ферментативной активности по сравнению с идуронат-2-сульфатазой, которая не образует слитый белок (фиг. 5).

Пример 5-2. Ферментативная активность слитого белка арилсульфатазы В длительного действия *in vitro*.

Авторы настоящего изобретения измеряли и сравнили ферментативную активность слитого белка арилсульфатазы В длительного действия, полученного в примерах выше, с ферментом арилсульфатазой В (Naglazyme®, BioMarin) природного происхождения.

В частности, слитый белок арилсульфатазы В длительного действия и арилсульфатаза В взаимодействовали с 4-метилумбеллиферил-сульфатом при 37°C в течение 20 мин и *in vitro* ферментативную активность слитого белка арилсульфатазы В длительного действия измеряли путем измерения флуоресценции 4-метилумбеллиферила, образовавшегося после расщепления сульфатной группы.

В результате было подтверждено, что арилсульфатаза В и слитый белок арилсульфатазы В длительного действия имеют ферментативную активность (специфическую активность) $438,5 \pm 29,4$ нмоль/мин/мМ и $823,8 \pm 37,0$ нмоль/мин/мкМ соответственно. Так как слитый белок арилсульфатазы В длительного действия имеет структуру, в которой две арилсульфатазы В соединены с одной молекулой Fc, которая является димерной формой двух цепей Fc, результаты измерения показали, что слитый белок арилсульфатазы В длительного действия имеет примерно в 1,9 раз более высокую ферментативную активность *in vitro* по сравнению с арилсульфатазой В, которая не является слитым белком. Эти результаты подтвердили, что отличительная структурная характеристика слитого белка арилсульфатазы В длительного действия на молекулярном уровне по сравнению с арилсульфатазой В обеспечивает великолепную ферментативную активность (фиг. 6).

В результате анализа фармакокинетики ферментного слитого белка в примерах 5-1 и 5-2, было подтверждено, что эти ферментные слитые белки показывали более высокую ферментативную активность *in vitro* по сравнению с ферментами, с которыми не слит Fc-участок.

Пример 6. Подтверждение эффективности введения слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия.

Эффективность введения ферментного слитого белка по настоящему изобретению определяли путем изучения изменений в количестве гликозаминогликана (GAG) в тканях и моче после введения лекарственных средств мышам с нокаутом по идуронат-2-сульфатазе (IDS).

В частности, в дополнение к нормальным мышам в качестве отрицательной контрольной группы, IDS-нокаутных мышей в возрасте 7-14-недель разделяли в общей сложности на четыре группы на основании содержания GAG в моче. Идуронат-2-сульфатазу (Elaprase®, Genzyme) вводили в общей сложности 4 раза (сутки 0, сутки 7, сутки 14 и сутки 21) в хвостовую вену в концентрации 0,5 мг/кг (контрольная группа). За введением слитого белка идуронат-2-сульфатазы длительного действия следовало разделение на две группы: одной группе вводили один раз слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия в хвостовую вену в концентрации 2,0 мг/кг (сутки 0), и другой группе вводили подкожно один раз слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия в концентрации 4,0 мг/кг (сутки 0).

Образцы мочи собирали из каждой группы перед введением, а также на 7, 14, 21 и 28-е сутки после введения лекарственного средства. Все ткани из печени, селезенки, сердца и костного мозга были собраны на 28-е сутки после введения лекарственного средства. Затем к каждой ткани в количестве 5 объемов (9 объемов для костного мозга) добавляли тканевой измельчающий буфер (PBS, содержащий аprotинин (1 мкг/мл), 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфторид) и 2 мМ EDTA), и затем смесь измельчали с помощью ультразвукового диспергатора и центрифугировали, и каждый супернатант использовали для анализа содержания GAG.

Затем 50 мкл супернатанта, полученного после измельчения собранных образцов мочи и каждой ткани, добавляли в 96-луночный планшет, добавляли раствор диметилметиленового синего (250 мкл) и перемешивали, и количества GAG определяли при длине волны 525 нм. В случае содержания GAG в моче, значения рассчитывали путем корректировки с учетом количества креатина. Статистический анализ проводили между контрольной и экспериментальной группами с использованием однофакторного ANOVA (дисперсионного анализа) с использованием расчетных значений. Измеренное содержание GAG в моче и в каждой ткани показано на фиг. 7 и 8 соответственно.

Как показано на фиг. 7 и 8, было подтверждено, что слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия, даже при однократном внутривенном или подкожном введении в месяц, значительно снижал значения GAG в моче и в каждой ткани до уровня, аналогичного терапии, когда Elaprase®, представляющий собой фермент, с которым Fc-участок не слит, вводят внутривенно один раз в неделю, по

сравнению с IDS-нокаутными мышами.

Этим примером было подтверждено, что, благодаря увеличенному времени полужизни в крови, слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия, даже при однократном внутривенном или подкожном введении в месяц, может демонстрировать эффект, эквивалентный эффекту существующей медикаментозной терапии, когда лекарственное средство вводят один раз в неделю. Кроме того, результаты, показывающие что слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия демонстрировал эффект снижения значений GAG в группе, когда слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия вводили подкожно один раз в месяц, подтвердили, что слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия может быть использован для подкожной инъекции слитых белков по настоящему изобретению в качестве пути введения. Соответственно, предполагается, что слитый белок идуронат-2-сульфатазы длительного действия по настоящему изобретению может быть использован для лечения пациентов с синдромом Хантера путем введения или подкожного введения один раз в месяц.

Пример 7. Подтверждение распределения в тканях слитого белка (арилсульфатазы В) длительного действия.

Авторы настоящего изобретения предприняли попытку определить степень распространения ферментных слитых белков по настоящему изобретению, полученных в примерах выше.

С этой целью степень распределения арилсульфатазы В (контрольная группа) и слитого белка арилсульфатазы В длительного действия (экспериментальная группа) в тканях и органах 3 ICR-мышей сравнивали для каждой коллекции образцов и для каждой группы.

В частности, контрольной и экспериментальной группе вводили внутривенную инъекцию с концентрацией 5,0 мг/кг на основе концентрации арилсульфатазы В.

Что касается природной арилсульфатазы В (Naglazyme®) контрольной группы и слитого белка арилсульфатазы В длительного действия экспериментальной группы, концентрацию каждого вещества в тканях (костный мозг, печень, селезенка, легкие, почки и сердце) измеряли и сравнивали посредством иммуноферментного анализа после извлечения органов мыши после введения природной арилсульфатазы В (Naglazyme®) и слитого белка арилсульфатазы В длительного действия.

Слитый белок арилсульфатазы В длительного действия показал в результате, что он распределяется в более высокой степени или на более длительный период времени в тот же самый промежуток времени во всех тканях, по сравнению с природной арилсульфатазой В, которую использовали в качестве контрольной группы и которая не была слита с Fc-участком.

В частности, было подтверждено, что слитый белок арилсульфатазы В длительного действия имеет значительно более высокую степень распределения в костном мозге и селезенке, по сравнению с природной арилсульфатазой В. Кроме того, было подтверждено, что слитый белок арилсульфатазы В длительного действия распределялся в легких, почках и сердце, в то время как арилсульфатаза В не была обнаружена в этих тканях (фиг. 9).

На основании этих экспериментальных результатов было показано, что слитый белок арилсульфатазы В длительного действия обладает лучшими фармакокинетическими характеристиками по сравнению с Naglazyme® (т.е. природной арилсульфатазой В). В частности, возможное применение слитого белка арилсульфатазы В длительного действия при однократном введении в месяц, по сравнению с существующей терапией с внутривенным введением раз в неделю, может не только снизить частоту введения, но также и способствовать улучшению качества жизни пациентов благодаря переходу к подкожному введению.

Исходя из вышесказанного, специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение, может понять, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения технических концепций или существенных характеристик настоящего изобретения. В этом отношении примеры воплощений, раскрытые в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Напротив, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает не только приведенные в качестве примера воплощения, но также и различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть включены в рамках сущности и объема настоящего изобретения, как они определены прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ферментный слитый белок, где Fc-участок иммуноглобулина слит с терапевтическим ферментом и указанный терапевтический фермент имеет увеличенное время существования *in vivo* по сравнению с терапевтическим ферментом, с которым не слит Fc-участок иммуноглобулина,

где этот ферментный слитый белок имеет повышенную стабильность и пониженную аффинность связывания с лизосомными рецепторами, и посредством этого высокую степень распределения в тканях, по сравнению с терапевтическим ферментом, который не слит с Fc-участком иммуноглобулина,

где в указанном Fc-участке иммуноглобулина не происходит обмена цепей, где терапевтический фермент и Fc-участок иммуноглобулина слиты посредством пептидного линкера;

где терапевтический фермент выбран из группы, состоящей из идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы А, В, и

где в указанном Fc-участке иммуноглобулина, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 2-ая аминокислота заменена пролином; 71-ая аминокислота заменена глутамином; или 2-ая аминокислота заменена пролином и 71-ая аминокислота заменена глутамином.

2. Ферментный слитый белок по п.1, где ферментный слитый белок представляет собой слияние одной молекулы Fc-участка иммуноглобулина и димерного терапевтического фермента.

3. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения лизосомной болезни накопления (LSD), содержащая ферментный слитый белок по п.1 или 2, где лизосомная болезнь накопления (LSD) представляет собой мукополисахаридоз (MPS) или синдром Хантера; или где композиция снижает аффинность связывания фермента с лизосомными рецепторами.

4. Полинуклеотид, кодирующий ферментный слитый белок по п.1 или 2.

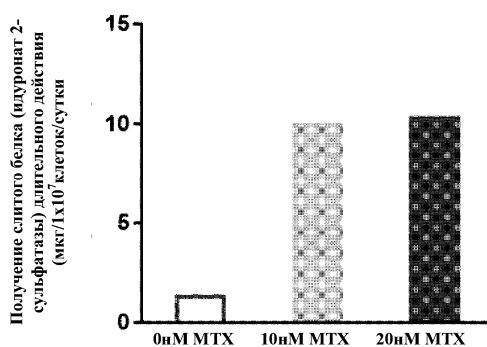
5. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.4.

6. Трансформант, в который введен экспрессионный вектор по п.5.

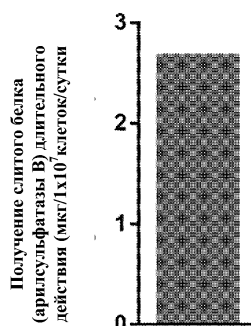
7. Способ получения ферментного слитого белка, включающий:

(а) культивирование трансформанта по п.6 с получением культуры; и

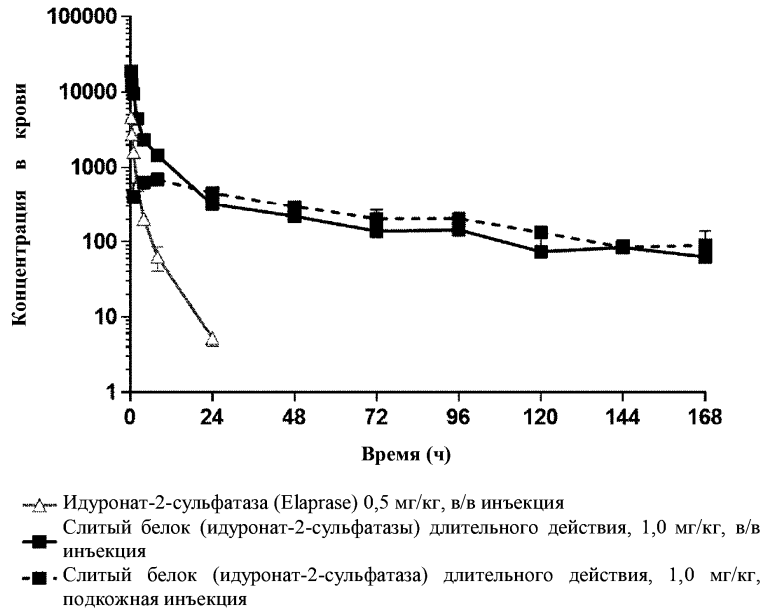
(б) выделение ферментного слитого белка из этой культуры.



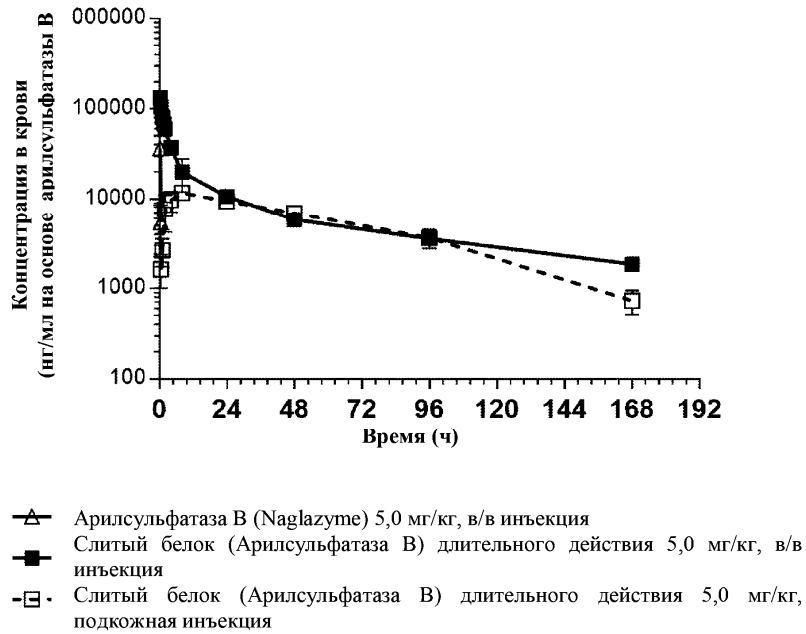
Фиг. 1



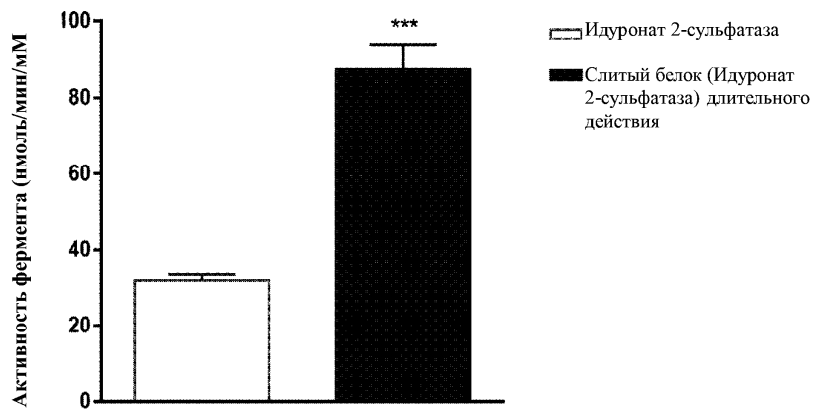
Фиг. 2



Фиг. 3

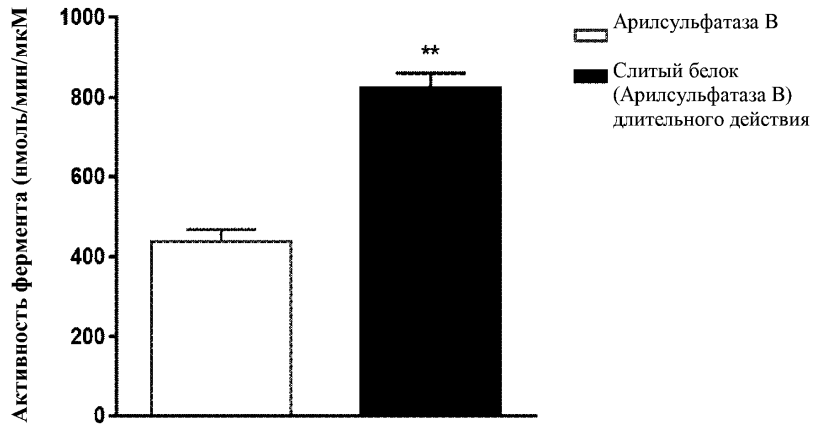


Фиг. 4



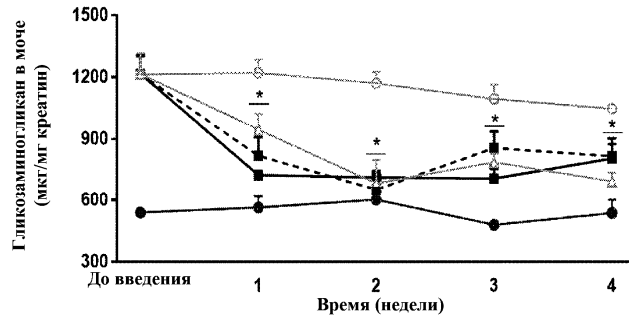
*** $p < 0,001$ в сравнении с идуронат-2-сульфатазой согласно непарному t-критерию Стьюдента

Фиг. 5



$p < 0,01$ в сравнении с арилсульфатазой В согласно непарному t-критерию Стьюдента

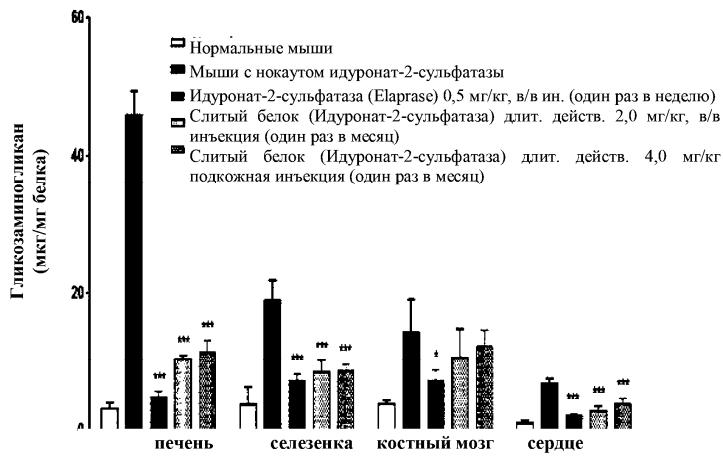
Фиг. 6



- Нормальные мыши
- Мыши с нокаутом идуонат-2-сульфатазы
- △ Идуонат-2-сульфатаза (Elaprase) 0,5 мг/кг, в/в инъекция (один раз в неделю)
- Слитый белок (Идуонат-2-сульфатаза) длит. действ. 2,0 мг/кг, в/в инъекция (один раз в месяц)
- Слитый белок (Идуонат-2-сульфатаза) длит. действ. 4,0 мг/кг подкожная инъекция (один раз в месяц)

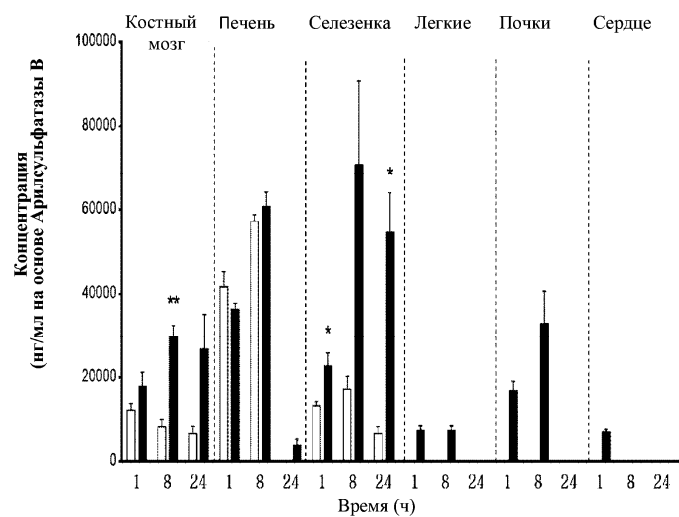
* $p < 0,05$ в сравнении с мышью с нокаутом по идуонат-2-сульфатазе согласно однофакторному ANOVA

Фиг. 7



* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ в сравнении с мышью с нокаутом по идуонат-2-сульфатазе согласно однофакторному ANOVA

Фиг. 8



□ Арилсульфатаза В

■ Слитый белок длительно действия (Арилсульфатаза В)

* $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ в сравнении с арилсульфатазой В согласно непарному t-критерию Стьюдента

Фиг. 9

