

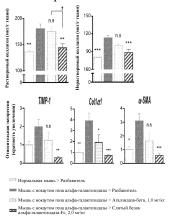
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2023.07.04
- (22) Дата подачи заявки 2021.11.15

- (51) Int. Cl. A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01) A61P 13/12 (2006.01)
- (54) ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТОГО С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТОМ БЕЛКА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ИЛИ СВЯЗАННОГО С БОЛЕЗНЬЮ ФАБРИ
- (31) 10-2020-0152247
- (32) 2020.11.13
- (33) KR
- (86) PCT/KR2021/016630
- (87) WO 2022/103221 2022.05.19
- (71) Заявитель: XAHMИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)
- (72) Изобретатель:
 Чой Дже Хёк, Ким Джин Ён, Пак Чо
 Рон, Ким Сан Юн, Ким Чон А, Чан Ду
 Со (KR)
- (74) Представитель:
 Билык А.В., Поликарпов А.В.,
 Соколова М.В., Путинцев А.И.,
 Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
 А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
 (RU)

202390893

(57) Изобретение относится к применению слитого белка на основе терапевтического фермента и Fc-области иммуноглобулина для предупреждения или облегчения почечного заболевания, вызванного или связанного с болезнью Фабри.



PCT/KR2021/016630

МПК:

A61K 38/00 (2006.01) **A61K 47/68** (2017.01) **A61K 38/47** (2006.01) **A61P 13/12** (2006.01)

ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТОГО С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТОМ БЕЛКА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ИЛИ СВЯЗАННОГО С БОЛЕЗНЬЮ ФАБРИ

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению белка, слитого с ферментом, в том числе с терапевтическим ферментом, для предупреждения и лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Предшествующий уровень техники

Лизосомальные болезни накопления (LSD) представляют собой разновидность наследственных метаболических нарушений, возникающих в результате утраты функционирования лизосом. LSD вызываются дефицитом ферментов, которые расщепляют такие вещества, как липиды, белки, полисахариды и т.д., и обычно они возникают с частотой 1 случай на 100000 и наследуются как рецессивные признаки. LSD возникают, когда имеется дефицит конкретного фермента, обладающего таким расщепляющим действием, или его количество очень мало, и когда имеется дефицит такого фермента со способностью к расщеплению, то избыточные вещества накапливаются, не подвергаясь расщеплению, что в конечном итоге вызывает проблемы в функционировании клеток.

Болезнь Фабри, известная как одна из LSD, является разновидностью врожденного метаболического нарушения, возникающего в результате дефицита или отсутствия активности фермента альфа-галактозидазы, которая представляет собой гидролазу, присутствующую в лизосомах. Болезнь Фабри наследуется как рецессивная форма, ассоциированная с половыми хромосомами, и известно, что дефект альфапричиной аномального Gb3 галактозидазы является накопления (глоботриаозилцерамида) и лизо-Gb3 (глоботриаозилсфингозин) в стенках кровеносных сосудов и различных частях организма, например, в коже, почке, сердце, нервной системе и т.д., что тем самым оказывает влияние на кровообращение и вызывает снижение поступления питательных веществ. Могут возникать симптомы парестезии, сильной боли, ангиокератомы, сердечной ишемии, инфаркта миокарда, почечной недостаточности и т.д., результатом чего является почечная недостаточность и, в конечном итоге, летальный исход.

Альфа-галактозидаза представляет собой фермент, который катализирует расшепление Gb3 (глоботриаозилцерамида) и лизо-Gb3 до лактозилцерамида. Известно, что связанные с этим ферментом нарушения являются причиной аномального накопления Gb3 и лизо-Gb3 в стенках кровеносных сосудов и различных частях организма, что приводит к болезни Фабри.

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

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

В то же время болезнь Фабри вызывает повреждение органов вследствие накопления в органах, в том числе в почках, Gb3 и лизо-Gb3. В частности, в почках возникает воспалительная реакция, обусловленная накоплением Gb3 и лизо-Gb3, и в дальнейшем фиброз, что приводит к хроническим почечным заболеваниям и почечной недостаточности и в конечном итоге вызывает смерть пациентов. Для предотвращения дальнейшего прогрессирования болезни Фабри и для ее эффективного лечения важно подавлять и ослаблять воспалительную реакцию и фиброз почек на ранней стадии. Однако, разработка терапевтического агента, способного подавлять и ослаблять воспалительную реакцию и фиброз почек, в качестве терапевтического агента, применяемого в ферментозаместительной терапии, находится на недостаточном уровне.

Соответственно, возрастает важность разработки терапевтического агента, действующего в случае почечных заболеваний посредством подавления и ослабления

воспаления и фиброза почек, характеризующегося при этом большой продолжительностью пребывания в организме.

Описание

Техническая проблема

Существует потребность в разработке терапевтического агента, действующего в случае почечных заболеваний посредством подавления и ослабления воспаления и фиброза почек.

Техническое решение

Цель настоящего изобретения заключается в разработке фармацевтической композиции для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1

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

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

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

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

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в предложении применения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Полезные эффекты

Настоящее изобретение относится к применению слитого белка, содержащего терапевтический фермент, для предупреждения или ослабления почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри. Благодаря более высокой

продолжительности пребывания в организме слитый с ферментом белок может быть с пользой применен для пациентов, а также может быть эффективен для лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Описание графических материалов

На ФИГ. 1 показаны результаты сравнения распределений в тканях слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc) и агалзидазы-бета;

на ФИГ. 2 показаны результаты сравнения снижения уровней лизо-Gb3 под действием слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) и агалзидазыбета:

на ФИГ. 3 показаны результаты сравнения эффектов ослабления воспаления под действием слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) и агалзидазыбета; и

на ФИГ. 4 показаны результаты сравнения эффектов ослабления фиброза под действием слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α -галактозидаза-Fc) и агалзидазыбета.

Наилучший вариант осуществления изобретения

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

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

Химическая формула 1

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

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

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина; представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фермент представляет собой антипараллельный димер, образованный с использованием X и X $\dot{}$.

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

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

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

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

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

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

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

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-область иммуноглобулина содержит замену аминокислоты в положении 2 на пролин; замену аминокислоты в положении 71 на глутамин; или замену аминокислоты в положении 2 на пролин и замену аминокислоты в

положении 71 на глутамин в Fc-области иммуноглобулина, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

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

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

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

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

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что среди почечных заболеваний по меньшей мере одно выбрано из группы, состоящей из нефрита, гломерулонефрита, нефротического синдрома, нефропиелита, фиброза почек, хронического заболевания почек, почечной недостаточности и нарушения функции почек.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фиброз почек включает нефрогенный системный фиброз (NSF) или кистозный фиброз.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическая композиция проявляет одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик у индивида, которому вводят данную фармацевтическую композицию:

- (1) сниженный уровень лизо-Gb3 или Gb3 в почечной ткани;
- (2) сниженный уровень TIMP-1 (тканевого ингибитора металлопротеиназы-1) в почечной ткани;
 - (3) сниженный уровень коллагена 1 типа α1 в почечной ткани;
 - (4) сниженный уровень α-SMA (альфа-актина гладких мышц) в почечной ткани;

(5) сниженный уровень растворимого коллагена и нерастворимого коллагена в почечной ткани.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фиброз почек связан с воспалением или вызывается воспалением.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическая композиция проявляет одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик у индивида, которому вводят данную фармацевтическую композицию:

- (1) сниженный уровень фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) в почечной ткани;
 - (2) сниженный уровень интерлейкина-6 (ІL-6) в почечной ткани;
- (3) сниженный уровень хемокина, регулируемого при активации, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками (RANTES), в почечной ткани; и
 - (4) сниженный уровень рецептора 1 TNF (TNFR1) в крови.

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что способность слитого с ферментом белка к направленному действию в тканях почек повышена по сравнению с таковой у фермента, не являющегося слитым с белком.

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

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

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

Фармацевтическая композиция по любому из вышеупомянутых конкретных воплощений характеризуется тем, что слитый с ферментом белок представляет собой

димер, образованный из мономеров, в котором одна молекула альфа-галактозидазы и одна молекула Fc-области иммуноглобулина соединены через пептидный линкер.

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

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

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для приготовления профилактического или терапевтического агента в случае почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Способ осуществления изобретения

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

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

По всему тексту описания использованы не только общепринятые однобуквенные или трехбуквенные коды для природных аминокислот, но также и такие трехбуквенные коды, как Aib (α-аминоизомасляная кислота), Sar (N-метилглицин) и т.д., обычно используемые для других аминокислот. Помимо этого, аминокислоты, упомянутые в

данном описании в сокращенном виде, приведены в соответствии с правилами номенклатуры по IUPAC-IUB (Международный союз по теоретической и прикладной химии/Международный биохимический союз).

| A | Аргинин | R |
|---|---------------------------------|---|
| N | Аспарагиновая кислота | D |
| C | Глутаминовая кислота | E |
| Q | Глицин | G |
| Н | Изолейцин | I |
| L | Лизин | K |
| M | Фенилаланин | F |
| P | Серин | S |
| T | Триптофан | W |
| Y | Валин | V |
| | N C Q H L M P | N Аспарагиновая кислота С Глутаминовая кислота Q Глицин Н Изолейцин L Лизин М Фенилаланин Р Серин Т Триптофан |

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

Химическая формула 1

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

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

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

В одном из воплощений фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый разбавитель и слитый с ферментом белок, представленный химической формулой 1, в фармацевтически эффективном количестве. Использованный в данном описании термин «фармацевтически эффективное количество» означает безопасную дозировку слитого с

ферментом белка, при которой не наблюдается проявления токсичности или побочных эффектов у пациентов с оказанием при этом профилактического или терапевтического действия в отношении почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри, но этим не ограничивается.

Использованный в данном описании термин «слитый с ферментом белок» означает белок, в котором Fc-область иммуноглобулина слита с терапевтическим ферментом таким образом, что терапевтический фермент может сохранять свою активность при одновременном снижении аффинности его связывания с рецепторами лизосом вследствие наличия слияния с Fc-областью иммуноглобулина, в результате чего увеличивается его время полужизни в крови по сравнению с терапевтическим ферментом, не слитым с Fc-областью иммуноглобулина. Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства для ферментозаместительной терапии (ERT). Применяя ферментозаместительную терапию, можно предотвращать или лечить заболевание посредством восстановления ухудшенной функции фермента путем восполнения дефектного или дефицитного фермента, вызывающего заболевание.

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

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

Использованный в данном описании термин «терапевтический фермент» относится к ферменту для лечения заболеваний, возникающих вследствие недостатка, дефицита, нарушения функционирования и т.д. ферментов, и относится к ферменту, с использованием которого можно лечить индивида с заболеваниями посредством ферментозаместительной терапии, введения и так далее. Терапевтический фермент, который может быть включен в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, конкретно не ограничен, и в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению может быть включен любой терапевтический фермент, при условии, что он является терапевтическим ферментом, позволяющим получать преимущества благодаря большей продолжительности полужизни *in vivo*, чем у терапевтического фермента в неслитой форме. В одном из воплощений настоящего изобретения слитый с ферментом белок представляет собой слитый с терапевтическим ферментом белок.

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

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

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

При этом такие терапевтические ферменты, составляющие димер, могут быть в форме параллельного димера или антипараллельного димера в зависимости от направления, в котором они соединяются, но этим не ограничиваются. В качестве

конкретного примера, что касается фермента в химической формуле 1, то X и X' могут образовывать антипараллельный димер, но этим не ограничиваются.

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

Использованный в данном описании термин «параллельный димер» означает, что N-конец и C-конец аминокислотной последовательности каждого мономера участвуют в образовании димера, располагаясь в одном направлении, когда в образовании димера участвует каждый из мономеров. При этом димер может образовываться посредством нековалентной связи или ковалентной связи, но этим не ограничивается.

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

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

В частности, при образовании вышеупомянутых димеров образование параллельного или антипараллельного димера может происходить таким образом, что

как только Fc-области иммуноглобулинов образуют димер, соединенная с ними альфагалактозидаза мономеров образует димер посредством ковалентной связи или нековалентной связи.

Фермент, включенный в состав слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, может представлять собой альфа-галактозидазу. С учетом целей настоящего изобретения слитый с ферментом белок может включать димерный терапевтический фермент, в частности, димер, образованный альфа-галактозидазой, или димер, образованный альфа-галактозидазой и другим терапевтическим ферментом, но этим не ограничивается. Пример слитого белка по настоящему изобретению может включать слитый белок, где в химической формуле 1 X и X' могут быть альфа-галактозидазами, и аминокислотные последовательности X и X' могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, как X, так и X' могут представлять собой природные альфа-галактозидазы или одна из X и X' может представлять собой природную альфа-галактозидазу, а другая может представлять собой вариант, в котором часть последовательности природной альфа-галактозидазы модифицирована, но этим не ограничиваясь. Альтернативно, X и X' могут представлять собой варианты альфа-галактозидаз, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, но этим не ограничиваются.

Использованный в данном описании термин «альфа-галактозидаза (α-GAL) или альфа-галактозидаза А (α-GAL А)» относится к ферменту, присутствующему в лизосомах селезенки, головного мозга, печени и т.д., который катализирует гидролиз концевых альфа-галактозильных группировок в гликолипидах и гликопротеинах и представляет собой гомодимерный гликопротеин. В частности, известно, что альфа-галактозидаза катализирует гидролиз церамид-тригексозида и гидролиз мелибиозы до галактозы и глюкозы и, в частности, известно, что она ассоциирована с болезнью Фабри, которая является лизосомной болезнью накопления. Поскольку дефект и дефицит альфа-галактозидазы, которые являются причиной болезни Фабри, могут быть восполнены ферментозаместительной терапией (ERT) с использованием слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, то слитый с ферментом белок может проявлять терапевтическое действие в отношении различных почечных заболеваниях, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

В настоящем изобретении альфа-галактозидаза может включать рекомбинантную форму агалзидазы-альфа или агалзидазы-бета, и в объем настоящего изобретения может

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

Хотя в настоящем изобретении пептид описан как пептид, «состоящий из» последовательности с конкретным порядковым номером, при условии, что данный пептид обладает активностью, идентичной или эквивалентной таковой у пептида, состоящего из данной аминокислотной последовательности с соответствующим порядковым номером, очевидно, что это не исключает добавления не являющейся смысловой последовательности перед аминокислотной последовательностью или после аминокислотной последовательности с соответствующим порядковым номером, наличия природной мутации или молчащей мутации, и такое добавление или такая мутация в последовательности включены в объем настоящего изобретения. Другими словами, даже при наличии различия в некоторых последовательностях, при условии, что она показывает гомологию на предварительно заданном уровне или более высоком уровне и проявляет активность, эквивалентную или аналогичную таковой у природной альфа-галактозидазы, она может попадать в объем настоящего изобретения.

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

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

Имеют ли любые две пептидные последовательности гомологию, сходство или идентичность, можно определить, применяя известные компьютерные алгоритмы, такие как программа в формате «FASTA», например, использующая параметры по умолчанию,

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

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

Информацию о последовательностях терапевтических ферментов или их производных и кодирующих их нуклеотидных последовательностях можно получить из

известной базы данных, например, NCBI и так далее.

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

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

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

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

Аналоги терапевтических ферментов могут включать биоаналоги соответствующих терапевтических ферментов и биопревосходные лекарственные средства. Например, что касается биоаналогов, то с учетом разницы в экспрессии в организме хозяина по сравнению с известным терапевтическим ферментом, разницы в характеристике и степени его гликозилирования, а также разницы в степени замены в

конкретном аминокислотном остатке соответствующего фермента в свете стандартной последовательности, когда степень замены не равна замене на 100%, они относятся к ферментам-биоаналогам, которые могут быть использованы в качестве слитого с ферментом белка по настоящему изобретению. Терапевтические ферменты могут быть получены или произведены известным в данной области техники методом, конкретно, путем генетической рекомбинации в клетках животных, *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых, растительных клетках, в живых животных и т.д., и способ получения этим не ограничивается, и имеющиеся в продаже терапевтические ферменты могут быть приобретены и использованы, но ими не ограничиваются.

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

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

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

С учетом целей настоящего изобретения то положение, в котором пептидный линкер слит с терапевтическим ферментом и Fc-областью иммуноглобулина, не

ограничивается, при условии, что пептидный линкер может быть использован для присоединения терапевтического фермента к Fc-области иммуноглобулина с сохранением при этом активности терапевтического фермента. Конкретно, данное положение может находиться на обоих концах терапевтического фермента и Fc-области иммуноглобулина, и более конкретно, данное положение может находиться на C-конце терапевтического фермента и N-конце Fc-области иммуноглобулина, но этим не ограничивается.

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

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

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

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

В настоящем изобретении пептидные линкеры могут быть соответственно присоединены к димерной Fc-области иммуноглобулина, образованной мономерными Fc-областями иммуноглобулинов, при этом линкеры, присоединенные к

соответствующим Fc-областям иммуноглобулинов могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

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

Кроме того, в настоящем изобретении F в химической формуле 1 слитого с ферментом белка может представлять собой Fc-область иммуноглобулина, происходящую из IgG, конкретно, Fc-область IgG4, и может быть негликозилированной областью, но этим не ограничивается. Кроме того, F может представлять собой Fc-область иммуноглобулина, полученную путем замены одной или нескольких аминокислот в Fc-области IgG4 человека, но этим не ограничивается.

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

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

Fc-область иммуноглобулина представляет собой вещество, используемое в качестве носителя при получении лекарственных средств, и в последнее время активно проводятся исследования слитых белков, в которых используют Fc-область иммуноглобулина, чтобы стабилизировать белки и предотвратить их удаление из почек. Иммуноглобулины являются основными составляющими крови, и существует пять различных типов, таких как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Наиболее часто используемым типом в исследованиях слитых белков является IgG, и его подразделяют на четыре подтипа IgG1-4. Присутствие слитых белков, полученных с использованием Fc-области

иммуноглобулина, может увеличивать размер белков, предотвращая тем самым их удаление из почек, и также может способствовать связыванию с неонатальными Fc-рецепторами (FcRn), участвуя тем самым в увеличении периода полувыведения из крови посредством эндоцитоза и рециркуляции в клетках.

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

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

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

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

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

Гс-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой 1) СН1-домен, СН2-домен, СН3-домен и СН4-домен, 2) СН1-домен и СН2-домен, 3) СН1-домен и СН3-домен и СН3-домен и СН3-домен и 5) комбинацию, состоящую из одного домена либо двух или более доменов, выбранного(ых) из СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена, и шарнирной области (или части шарнирной области) иммуноглобулина, но этим не ограничивается. Более конкретно, Fс-область иммуноглобулина может состоять из шарнирной области, СН2-домена и СН3-домена, но этим не ограничивается.

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

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

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

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

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

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

Конкретно, шарнирная область может представлять область, имеющую изменение, при этом часть шарнирной области делетирована, чтобы включать только один остаток цистеина (Cys); или может представлять область, в которой остаток серина (Ser), участвующий в обмене цепями, заменен на остаток пролина (Pro), и более конкретно, область, в которой 2-ой остаток серина в последовательности шарнирной области заменен на остаток пролина, но этим не ограничивается.

В качестве одного примера, шарнирная область по настоящему изобретению может содержать или может (по существу) состоять из последовательности Pro-Pro-Cys-Pro (SEQ ID NO: 31), и Fc-область иммуноглобулина может включать в себя последовательность шарнирной области SEQ ID NO: 31, но этим не ограничивается.

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

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

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

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

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

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

Использованный в данном описании термин «обмен цепями» относится к проблеме, заключающейся в том, что, если в качестве носителя для структуры слитого белка используют Fc-область IgG4, то эта Fc-область IgG4 образует гибрид с IgG4, присутствующим *in vivo*, или присутствует в виде мономера и изменяет исходную

структуру с приобретением структуры с низкой терапевтической активностью, и ранее сообщалось, что имеются значительные трудности, когда структура слитого белка, в которой имеет место слияние с белком, используется для терапевтических целей (van der Neut Kolfschoten, et al., Science, 317: 1554-1557, 2007).

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

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

Кроме этого, могут существовать различные типы аналогов, например, аналог, в котором удален сайт, способный к образованию дисульфидной связи, аналог, в котором удалены некоторые аминокислотные остатки на N-конце нативной Fc-области, аналог, в котором к N-концу нативной Fc-области присоединен остаток метионина, и так далее. для устранения эффекторной функции могут комплементсвязывающие сайты, например, сайты связывания С1q (первого компонента системы комплемента) или сайты, связанные с антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (АДСС). Способы получения таких аналогов для **Fc-**области иммуноглобулина последовательности раскрыты публикациях международных патентных заявок №№ WO 97/34631, WO 96/32478 и так далее.

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

Кроме того, описанные выше аналоги Fc-области могут представлять собой

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

Кроме того, такая Fc-область может быть получена из нативных форм, выделенных из людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и т.д., или может представлять собой их рекомбинантные формы или аналоги, полученные из трансфицированных клеток животных или из микроорганизмов. В данном описании способом получения Fc-области из нативной формы может быть способ выделения целых молекул иммуноглобулина из организмов человека или животного и затем обработки этих молекул протеазой. В результате обработки папаином происходит расщепление на Fab- и Fc-области, а в результате обработки пепсином происходит расщепление на фрагменты pF'c и F(ab)2. Эти фрагменты могут быть подвергнуты эксклюзионной хроматографии с целью выделения Fc или pF'c. В более конкретном воплощении Fc-область может представлять собой Fcрекомбинантного имму ноглобулина, при область ЭТОМ происходящую ИЗ иммуноглобулина человека Fc-область получают с использованием микроорганизма.

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

Использованный в данном описании термин «дегликозилирование» относится к ф

ерментативному удалению гликана из Fc-области, а термин «агликозилирование» относи тся к получению негликозилированной Fc-области, продуцируемой в прокариотах, в бол ее конкретном воплощении, в $E.\ coli.$

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

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область, происходящую из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM либо их комбинации или гибрида. В более кон кретном воплощении она может происходить из IgG или IgM, которые являются самыми распространенными белками в крови человека, и в еще более конкретном воплощении о на может происходить из IgG, что, как известно, увеличивает периоды полувыведения л игандсвязывающих белков. В более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобули на может представлять собой Fc-область IgG4, и в еще более конкретном воплощении F с-область иммуноглобулина может представлять собой негликозилированную Fc-область, происходящую из человеческого IgG4, и в наиболее конкретном воплощении аминокислотная последовательность Fc-области иммуноглобулина имеет SEQ ID NO: 9, а кодирующая ее полинуклеотидная последовательность может иметь SEQ ID NO: 7, но этим не ограничивается.

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

Кроме того, терапевтический фермент или слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может быть в такой форме, когда N-конец и/или С-конец не будет модифицирован, однако, для защиты терапевтических ферментов от действия протеаз *in vivo* и для повышения стабильности в объем терапевтических ферментов или слитых с ферментом белков по настоящему изобретению также включены такие варианты, когда их N-конец и/или С-конец будут химически модифицированы или защищены группами органических соединений либо когда конец данного пептида будет

модифицирован путем присоединения аминокислоты, и так далее. В случае, когда С-конец не модифицирован, этот конец терапевтического фермента или слитого с ферментом белка по настоящему изобретению может иметь карбоксильную группу, но конкретно этим не ограничивается.

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

Использованный в данном описании термин «N-конец» относится к амино-концу белка или полипептида и может включать в себя самый концевой аминокислотный остаток амино-конца или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 либо более аминокислот, начиная от самого концевого остатка. Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать в себя последовательность шарнирной области на N-конце, но этим не ограничивается.

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

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

Использованный в данном описании термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, происходящей из фармацевтически приемлемых неорганических солей, органических солей или оснований. Примеры подходящих

кислот могут включать соляную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-*n*-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и так далее. Примеры солей, происходящих из подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов, таких как натрий, калий и т.д., щелочноземельных металлов, таких как магний, аммония и так далее.

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

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

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

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

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

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок в фармацевтически эффективном количестве и возможно дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

Композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что продолжительность пребывания и стабильность терапевтического фермента *in vivo* повышаются.

Было подтверждено, что слитый с ферментом, в том числе с альфагалактозидазой, белок по настоящему изобретению может снижать уровень лизо-Gb3, который накапливается в почечной ткани вследствие дефекта альфа-галактозидазы, тем самым его можно использовать для лечения почечных заболеваний (например, нефрита, фиброза, почечной недостаточности и т.д.), вызываемых накоплением лизо-Gb3.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Что касается накопления Gb3 и лизо-Gb3 в почках, которое имеет место у пациентов с болезнью Фабри вследствие дефекта или дефицита альфа-галактозидазы и различных почечных заболеваний, вызываемыми этим, то эффект предотвращения, ослабления или лечения указанных выше нарушений может быть достигнут путем введения содержащего альфа-галактозидазу слитого белка по настоящему изобретению. В частности, поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению обладает эффектом в отношении снижения содержания лизо-Gb3 и подавления воспаления и фиброза в почках, то он может демонстрировать эффект предотвращения, ослабления или лечения почечных заболеваний, вызываемых накоплением Gb3 и лизо-Gb3, воспаления и фиброза.

В настоящем изобретении термин «почечные заболевания» означает, что клетки или ткани почек либо связанные с почками органы повреждаются и теряют свою функцию по различным причинам, и в настоящем изобретении почечные заболевания могут относиться к почечным заболеваниям, вызванным или связанным с болезнью

Фабри, и конкретно могут относиться к почечным заболеваниям, вызываемым накоплением Gb3 и лизо-Gb3 вследствие дефекта или дефицита альфа-галактозидазы, но этим не ограничиваются. Конкретные примеры почечных заболеваний могут включать нефрит, гломерулонефрит, нефротический синдром, нефропиелит, фиброз почек, хроническое заболевание почек, почечную недостаточность или нарушение функции почек, но этим не ограничиваются.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может подавлять или ослаблять воспаление, возникающее в почках, проявляя тем самым профилактическое или терапевтическое действие. В типичных воплощениях настоящего изобретения было подтверждено, что уровень лизо-Gb3 или Gb3 в почечной ткани снижался благодаря применению слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, и также было подтверждено, что экспрессия TNF-а, IL-6, RANTES и/или TNFR1, которые являются маркерами воспаления, ослаблялась или их секреция подавлялась, и это указывает на то, что слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может оказывать противовоспалительное действие, в частности, эффект подавления воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри, у индивида с воспалением (пример 4). В частности, слитый с ферментом белок может проявлять подавляющее действие в отношении воспаления, возникающего в почках, но не ограничивается конкретной тканью или органом, при условии, что он может проявлять противовоспалительное действие посредством снижения уровня экспрессии и/или секреции цитокинов.

Использованный в данном описании термин «воспаление» относится к воспалению, вызываемому накоплением Gb3 и лизо-Gb3 и представляющему собой главным образом опосредованный толл-подобным рецептором 4 (TLR4) воспалительный ответ, активируемый в результате распознавания липополисахарида (LPS). Известно, что Gb3 и лизо-Gb3, накапливаемые при болезни Фабри, сходны по структуре с LPS и поэтому способны активировать TLR4. Gb3 и лизо-Gb3, накапливаемые в органах, вызывают опосредованный TLR4 воспалительный ответ, приводящий к экспрессии воспалительных цитокинов.

Конкретные примеры заболеваний, обуславливаемых воспалением, которое происходит в почках, могут включать нефрит, гломерулонефрит, нефротический синдром, нефропиелит и т.д., но этим не ограничиваются, при условии, что такими заболеваниями является происходящее в почках воспаление, которое вызвано или связано с болезнью Фабри.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении фиброза почек, вызванного или связанного с болезнью Фабри, благодаря включению в нее слитого с ферментом белка.

Использованный в данном описании термин «фиброз» относится к состоянию, когда нет возможности осуществить обычный контроль в процессе заживления ран после повреждения тканей в организме человека в результате воспалительных реакций, обусловленных различными стрессовыми состояниями (инфекцией, раздражением химическими веществами, облучением и т.д.), и относится к образованию избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани в ходе репаративной реакции или реакции в ответ на раздражение в отличие от образования фиброзной ткани в органе или ткани в обычном объеме. В настоящем изобретении термин «фиброз» можно использовать взаимозаменяемо с термином «фиброзирование». В настоящем изобретении фиброз может представлять собой фиброз почек, вызванный болезнью Фабри или связанный с болезнью Фабри. Известно, что, у пациентов с болезнью Фабри фиброз происходит в почках вследствие накопления лизо-Gb3 без расщепления вследствие дефекта альфа-галактозидазы.

Поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно применять в случае ферментозаместительной терапии, то он может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении фиброза почек, вызванного или связанного с болезнью Фабри вследствие дефекта альфа-галактозидазы.

В термин «фиброз почек» может быть включен нефрогенный системный фиброз (NSF), кистозный фиброз и т.д., тем не менее можно включать любой фиброз почек без ограничения, при условии, что он может быть предотвращен или подвернут лечению композицией по настоящему изобретению.

Использованный в данном описании термин «фиброз почек» относится к симптому, при котором почечная функция утрачивается вследствие фиброза почечной ткани по таким причинам, как чрезмерное воспаление, происходящее в почечной ткани, и связанный с эпителиальными клетками фиброз. Поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может подавлять воспаление и фиброз, он может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении фиброза почек. С учетом целей настоящего изобретения одной из причин фиброза почек может быть накопление Gb3 и лизо-Gb3 в почках, но без ограничения этим.

В частности, при введении слитый с ферментом белок по настоящему изобретению или содержащая его фармацевтическая композиция может проявлять одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик:

- (1) сниженный уровень лизо-Gb3 или Gb3 в почечной ткани;
- (2) сниженный уровень TIMP-1 (тканевого ингибитора металлопротеиназы-1) в почечной ткани;
 - (3) сниженный уровень коллагена 1 типа а1 в почечной ткани;
- (4) сниженный уровень α -SMA (альфа-актина гладких мышц) в почечной ткани; и
- (5) сниженный уровень растворимого коллагена и нерастворимого коллагена в почечной ткани.

ТІМР-1, коллаген 1 типа α1 и α-SMA все являются показателями уровня фиброза, и снижение уровней их экспрессии, согласующееся с введением слитого ферментом белка, указывает на подавляющее действие слитого с ферментом белка в отношении фиброза. Помимо этого, снижение содержания растворимого коллагена и нерастворимого коллагена в почечной ткани, согласующееся с введением слитого с ферментом белка, также означает, что происходит подавление фиброза, и это свидетельствует об эффекте предотвращения или ослабления фиброза почек.

В настоящем изобретении фиброз почек может быть связан с воспалением или вызываться воспалением, но этим не ограничивается. Поскольку повторно возникающее воспаление представляет собой основную причину фиброза тканей, то фиброз почек по настоящему изобретению может быть вызван воспалением или связан с ним.

В частности, при введении слитый с ферментом белок по настоящему изобретению или содержащая его фармацевтическая композиция могут проявлять одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик:

- (1) сниженный уровень TNF-а в почечной ткани;
- (2) сниженный уровень ІL-6 в почечной ткани;
- (3) сниженный уровень RANTES в почечной ткани; и
- (4) сниженный уровень TNFR1 в крови.

TNF-α, IL-6, RANTES и TNFR1, все являются показателями воспаления, и снижение уровня этих показателей, согласующееся с введением слитого с ферментом белка по настоящему изобретению, означает ослабляющее воспаление действие или противовоспалительное действие слитого с ферментом белка.

Как уже описано, поскольку слитый с ферментом белок по настоящему изобретению или содержащая его композиция могут проявлять ослабляющее воспаление действие или противовоспалительное действие в почках и одновременно могут проявлять ослабляющее фиброз действие, то он/она может не только оказывать противовоспалительное и предотвращающее или ослабляющее фиброз действие, но также может проявлять превосходные терапевтические эффекты у индивидов с заболеваниями, при которых имеет место одновременное возникновение воспаления и фиброза.

В частности, по мере прогрессирования заболевания болезнь Фабри вызывает воспаление и фиброз в почках, и, таким образом, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно применять в качестве терапевтического агента, с использованием которого можно лечить болезнь Фабри на ранней стадии и предотвращать прогрессирование этого заболевания путем введения этого агента. В частности, согласно одному типичному воплощению настоящего изобретения, поскольку слитый с ферментом белок проявляет превосходные подавляющие действия в отношении воспаления и фиброза по сравнению с известным для лечения болезни Фабри терапевтическим агентом (агалзидазой-бета), то слитый с ферментом белок по настоящему изобретению можно применять в качестве полезного терапевтического агента для лечения фиброза, вызванного или связанного с болезнью Фабри (примеры 4 и 5).

В то же время известно, что воспаление и фиброз в почках приводят к хроническому заболеванию почек, нарушению функции почек, почечной недостаточности и т.д., что в итоге вызывает серьезное нарушение почечной функции. Преимущество слитого с ферментом белка по настоящему изобретению заключается в предупреждении прогрессирования до более поздней стадии болезни Фабри, за которой следуют хроническое заболевание почек, почечная недостаточность и т.д., посредством подавления воспаления и фиброза.

Почечные заболевания по настоящему изобретению могут включать почечные заболевания, вызванные воспалением и фиброзом почек, в частности, почечную недостаточность, нарушение функции почек и т.д., но этим не ограничиваются.

Использованный в данном описании термин «почечная недостаточность» относится к заболеванию, при котором происходит повреждение почки и утрата ею функции и которое можно подразделить на хроническую и острую почечную

недостаточность. Хроническая почечная недостаточность (хроническое заболевание почек (СКD)) представляет собой трудноизлечимое заболевание вследствие отсутствия функционирования почки в течение длительного периода времени, причиной которого могут быть повреждение и ослабление функции почки в результате длительно протекающего воспаления и фиброза почки. Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может проявлять профилактическое или терапевтическое действие в отношении почечной недостаточности путем подавления воспаления и фиброза.

Использованный в данном описании термин «нарушение функции почек» означает состояние с почечной дисфункцией, и в зависимости от степени тяжести его можно подразделять на легкое нарушение функции почек, умеренное нарушение функции почек или тяжелое нарушение функции почек, но этим не ограничиваясь. Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может способствовать восстановлению почечной функции путем подавления воспаления и фиброза, проявляя тем самым профилактическое или терапевтическое действие в отношении нарушения функции почек.

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

Использованный в данном описании термин «введение» относится к введению конкретного вещества пациенту любым подходящим способом, и путь введения композиции может представлять собой, но конкретно этим не ограничивается, любой общепризнанный путь, которым можно осуществлять доставку композиции в мишень *in vivo*, например, внутрибрюшинное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, интрадермальное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, внутрилегочное введение, интраректальное введение и так далее. Однако, поскольку пептиды расщепляются после перорального введения, то активные ингредиенты композиции для перорального введения предпочтительно покрывают оболочками или на их основе готовят препараты с защитой от расщепления в желудке, и, в частности, их можно вводить в инъекционной форме.

Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с использованием любого устройства, с помощью которого можно переносить активные ингредиенты в клеткумишень.

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

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

В частности, слитый с ферментом белок по настоящему изобретению обладает повышенной продолжительностью действия благодаря высокой стабильности и может сохранять ферментативную активность в течение длительного периода времени по сравнению с ферментами, которые не находятся в форме слитых белков. В одном типичном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что слитый с ферментом белок может не только сохраняться в органах в течение длительного периода

времени даже после введения, но также может оставаться распределенным в почечной ткани в течение длительного периода времени (пример 2). Поэтому слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может обладать повышенной способностью к направленному действию в тканях почек по сравнению с таковой у фермента, не являющегося слитым с белком, и может проявлять превосходные фармакологические эффекты путем непрерывного воздействия на ткани-мишени для осуществления лечения.

При применении слитого с ферментом белка по настоящему изобретению может не только поддерживаться его концентрация в ткани на предварительно заданном или более высоком уровне в течение длительного периода времени после введения, но также может наблюдаться высокая степень распределения в конкретной ткани, в частности, в почках, и поэтому слитый с ферментом белок можно с пользой использовать для лечения заболеваний, направленно затрагивающих соответствующую ткань. В одном типичном воплощении настоящего изобретения было подтверждено, что при введении слитого с ферментом белка мышам с нокаутом гена альфа-галактозидазы в режиме со сниженной частотой введения терапевтический эффект оказывался эквивалентным или превосходил таковой у фермента, не являющегося слитым белком. Соответственно, частота введения слитого с ферментом белка индивиду, нуждающемуся в этом, может быть снижена по сравнению с таковой для фермента, не являющегося слитым белком, но этим не ограничивается.

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

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

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

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

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

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

При этом примеры носителей, наполнителей и разбавителей, подходящих для препаратов, могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу,

поливинилпирролидон, воду, метилгидроксибензоат, пропилгидроксибензоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и так далее. Помимо этого, композиция может дополнительно включать в себя наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, смачивающий агент, корригент, консервант и так далее.

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

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

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри, при этом способ включает стадию введения индивиду слитого с ферментом белка или содержащей его композиции.

Слитый с ферментом белок, композиция, почечные заболевания, предупреждение и лечение являются теми же, которые описаны выше.

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

Использованный в данном описании термин «индивид» относится к индивиду с подозрением на наличие почечных заболеваний, а термин «индивид с подозрением на наличие почечных заболеваний» относится к млекопитающим, включая мышей, сельскохозяйственных животных и т.д., в том числе людей, которые уже имеют соответствующее заболевание или у которых может развиться заболевание, тем не менее индивид включает всех индивидов без ограничения, при условии, что они могут быть подвергнуты лечению слитым с ферментом белком по настоящему изобретению или

содержащей его композицией. В частности, индивидом может быть индивид, у которого развилась болезнь Фабри или который имеет высокий риск болезни Фабри, однако в объем настоящего изобретения включен любой индивид без ограничения, при условии, что у данного индивида развились или могут развиться почечные заболевания, ассоциированные с болезнью Фабри.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей слитый с ферментом белок. Соответствующая общая суточная доза может быть определена практикующим врачом в рамках корректного медицинского заключения, и композицию можно вводить один или несколько раз в виде разделенных доз. Однако, с учетом целей изобретения предпочтительно, чтобы конкретная терапевтически настоящего эффективная доза для любого конкретного пациента применялась по-разному в зависимости от различных факторов, включая тип и степень ответных реакций, которые должны быть достигнуты, конкретные композиции, в том числе независимо от того, будут ли в них периодически использованы другие агенты, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания пациента, продолжительность введения, путь введения, скорость экскреции композиции, продолжительность лечения, наличие других лекарственных средств, использованных в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Путь введения, вводимая доза и применимость являются теми же, которые описаны выше.

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

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

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри.

Слитый с ферментом белок, композиция, почечные заболевания, предупреждение и лечение являются теми же, которые описаны выше.

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

Слитый с ферментом белок, композиция, почечные заболевания, предупреждение и лечение являются теми же, которые описаны выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена противовоспалительная композиция, содержащая слитый с ферментом белок.

Слитый с ферментом белок, композиция, почечные заболевания, предупреждение и лечение являются теми же, которые описаны выше.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может оказывать противовоспалительное действие, облегчая или ослабляя воспаление путем снижения (1) уровня TNF-α в почечной ткани; (2) уровня IL-6 в почечной ткани; (3) уровня RANTES в почечной ткани; и/или (4) уровня TNFR1 в крови.

Слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может оказывать противовоспалительное действие посредством подавления воспалительных реакций, которые возникают вследствие накопления Gb3 и лизо-Gb3 в почках.

В частности, противовоспалительная композиция, содержащая слитый с ферментом белок по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри, но этим не ограничивается.

Слитый с ферментом белок и его противовоспалительное действие и фармацевтическая композиция являются теми же, которые описаны выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри, при этом способ включает стадию введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции индивиду, нуждающемуся в этом.

Слитый с ферментом белок и содержащая его композиция и воспаление являются теми же, которые описаны выше.

Использованный в данном описании термин «предупреждение» относится ко всем видам действий, связанным с подавлением или задержкой возникновения воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри, путем введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции, а термин «лечение» относится ко всем видам действий, связанным с ослаблением или благотворными изменениями воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри, путем введения слитого с ферментом белка или содержащей его композиции.

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

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

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей слитый с ферментом белок. Соответствующая общая суточная доза может быть определена практикующим врачом в рамках корректного медицинского заключения, и композицию

можно вводить один или несколько раз в виде разделенных доз. Однако, с учетом целей изобретения предпочтительно, чтобы конкретная терапевтически настоящего эффективная доза для любого конкретного пациента применялась по-разному в зависимости от различных факторов, включая тип и степень ответных реакций, которые должны быть достигнуты, конкретные композиции, в том числе независимо от того, будут ли в них периодически использованы другие агенты, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания пациента, продолжительность введения, путь введения, скорость экскреции композиции, продолжительность лечения, наличие других лекарственных средств, использованных в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Доза введения и применимость слитого с ферментом белка являются теми же, которые описаны выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение слитого с ферментом белка или содержащей его композиции для предупреждении или лечении воспаления, вызванного или связанного с болезнью Фабри.

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

Слитый с ферментом белок или содержащая его композиция, воспаление, предупреждение и лечение являются теми же, которые описаны выше.

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

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

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

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

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

Пробеден и из верего положения

Таблица 1

| Праймер | для | мутагенеза |
|---------|-----|------------|
| | | |

| Праймер | Последовательность | SEQ ID NO. |
|------------|---|---------------|
| Fc(S2P)_F | 5' - CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCT-3' | 1 |
| Fc(S2P)_R | 5' - AGGAACTCACGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3' | 2 |
| Fc(N71Q)_F | 5' - AGCCGCCGGACGAGCAGTTCCAAAGCACGTACCGTGTCGTCAG-3' | 3 |
| Fc(N71Q)_R | 5' - CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAACTGCTCCTCCCGCGGCT-3' | 4 |

Полинуклеотид, кодирующий синтезированный слитый белок альфагалактозидаза-Fc, встраивали в вектор ХОСС, представляющий собой экспрессирующий вектор, используя ферменты рестрикции. Ферментами рестрикции, которые не альфа-галактозидазы **Fc-**области катализируют расщепления участков иммуноглобулина, являются как BamHI, так и XhoI. Выделенный с применением указанных выше ферментов рестрикции фрагмент альфа-галактозидаза-Fc встраивали в вектор XOGC, подвергнутый расщеплению этими же ферментами рестрикции, тем самым завершая получение вектора, способного экспрессировать слитый белок альфагалактозидаза-Fc. Альфа-галактозидаза образует антипараллельный димер, когда Fcобласти иммуноглобулина образуют димер.

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

Таблица 2

| Название | Послед | овательность | SEQ ID |
|-----------------------|--------|--|--------|
| | | • | NO. |
| Альфа- | днк | ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG | 12 |
| галакто- зидаза-Fc | 1 | CTTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA | |
| зидаза-г с | | ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC | |
| | | ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA | |
| | | GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAGGATG | |
| | | CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA | |
| | | GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT | |
| | | TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT | |
| | | ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA | |
| | | TACTACGACA TEGATGCCCA GACCTTEGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT | |
| | | AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT | |
| | | ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC | |
| | | TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC | |
| | | AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG | |
| | | ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG | |
| | | GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT | |
| | | GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACTCAGA | |
| | | TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC | |
| | | CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT | |
| | | | |
| | | TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CTTAGACAGG | |
| | | GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT | |

| | GTAGCTATGA | TAAACCGGCA | GGAGATTGGT | GGACCTCGCT | CTTATACCAT | |
|-------|------------|--------------|--------------------|---------------------|--------------|----|
| | CGCAGTTGCT | TCCCTGGGTA | AAGGAGTGGC | CTGTAATCCT | GCCTGCTTCA | |
| | TCACACAGCT | CCTCCCTGTG | AAAAGGAAGC | TAGGGTTCTA | TGAATGGACT | |
| | TCAAGGTTAA | GAAGTCACAT | AAATCCCACA | GGCACTGTTT | TGCTTCAGCT | |
| | AGAAAATACA | ATGCAGATGT | CATTAAAAGA | CTTACTT GGC | GGCGGAGGTT | |
| | CAGGTGGTGG | TGGCTCTGGC | GGTGGAGGGT | CGGGGGGAGG | CGGCTCTGGA | |
| | GGAGGGGGCT | CCGGTGGGGG | <i>AGGTAGC</i> CCA | CCATGCCCAG | CACCTGAGTT | |
| | CCTGGGGGGA | CCATCAGTCT | TCCTGTTCCC | CCCAAAACCC | AAGGACACCC | |
| | TCATGATCTC | CCGGACCCCT | GAGGTCACAT | GCGTGGTGGT | GGACGTGAGC | |
| | CAGGAAGACC | CTGAGGTCCA | GTTCAACTGG | TACGTGGACG | GCGTGGAGGT | |
| | GCATAATGCC | AAGACAAAGC | CGCGGGAGGA | GCAGTTCCAA | AGCACGTACC | |
| | GTGTGGTCAG | CGTCCTCACC | GTCCTGCACC | AGGACTGGCT | GAATGGCAAG | |
| | GAGTACAAGT | GCAAGGTCTC | CAACAAAGGC | CTCCCATCCT | CCATCGAGAA | |
| | AACCATCTCC | AAAGCCAAAG | GGCAGCCCCG | AGAACCACAG | GTGTACACCC | |
| | TGCCCCCATC | CCAGGAGGAG | ATGACCAAGA | ACCAGGTCAG | CCTGACCTGC | |
| | | GCTTCTATCC | | | | |
| | | | | | CTGGACTCCG | |
| | | CTTCCTCTAC | | | | |
| | | ACGTCTTCTC | | | | |
| | | CAGAAGAGCC ' | | | | |
| | CCACIACACO | Сионичносс | iciccidic i | CIGGGIAAA 1 | UA. | |
| Белок | MOLRNPELHL | GCALALRFLA | LVSVDIPGAR | <u>A</u> LDNGLARTP | TNGVLHVERF | 13 |
| | NCNLDCQEEP | DSCISEKLEN | ENAELMYSEG | W K DAGYEYLC | I DDCVNA PQR | |
| | DSEGRLQADP | QRFPHGI RQL | anyvhskglk | LGIYADVGNK | TCAGFPGSFG | |
| | YYDIDAQTFA | DVGVDLLKFD | GCYCDSLENL | ADGYKHHIS LA | LNRTGRS I VY | |
| | | | | | | |

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

Пример 2. Исследование распределения в тканях слитого белка альфагалактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc)

Оценивали распределение слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc) в тканях после введения мышам с нокаутом (KO; от knock-out) гена альфа-галактозидазы (α-Gal A KO, Jackson Laboratory, инвентарный номер 003535).

Подробно, готовили и вводили: в группе 1 6,0 мг слитого белка альфагалактозидаза-Fc/кг (подкожным введением), а в группе 2 3,0 мг альфа-галактозидазы А (агалзидазы-бета)/кг (внутривенным введением), соответственно. Через 24 часа, 168 часов, 240 часов, 336 часов, 408 часов, 504 часа, 672 часа, соответственно, органы извлекали (n=3) и затем измеряли и сравнивали концентрации веществ в тканях (почках и селезенке) с использованием анализа ферментативной активности.

Чтобы измерить ферментативную активность в каждой ткани, готовили 4-метилумбеллиферил-α-D-галактопиранозид (4-MU-α-Gal), известный как субстрат для альфа-галактозидазы, в условиях поддержания температуры при 37°С в течение 30 минут и затем осуществляли взаимодействие раствора субстрата и образца ткани при 37°С в течение 60 минут. Ферментативную активность слитого белка альфа-галактозидаза-Fc оценивали, измеряя флуоресценцию образовавшегося в результате 4-метилумбеллиферона (4-MU). Для сравнения статистической значимости между

контрольной группой и экспериментальными группами проводили статистический анализ, применяя непарный t-критерий (** \sim ***p < 0,01 \sim 0,001).

В результате в группе, которой вводили слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, введенный фермент обнаруживали в тканях до 504 часов включительно после подкожного введения. В частности, в почках агалзидазу-бета не обнаруживали через 24 часа, в то время как слитый белок альфа-галактозидаза-Fc демонстрировал стабильное распределение до 408 часов включительно (ФИГ. 1).

Что касается сравнения распределения в тканях между группами, то наибольшую разницу в степени обнаружения наблюдали в почках. В почках слитый белок альфагалактозидаза-Fc по настоящему изобретению обнаруживали в достаточно высокой концентрации, в то время как агалзидазу-бета не обнаруживали.

Результаты распределения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc в тканях суммированы в приведенной ниже Таблице 3.

| | _ | _ |
|----|-----------|-----|
| | יווגוח מנ | วเร |
| 16 | аблица | aэ |

| Вещество | Вид ткани | AUC _{last} (нг*ч/мл или нг*ч/г) | Стах (нг/мл) | MRT _{last} (ч) |
|---------------------|-----------|--|--------------|-------------------------|
| Слитый белок альфа- | Почка | 136657,8 | 404,5 | 204,9 |
| галактозидаза-Fc | Селезенка | 1544744,3 | 4132,1 | 287,1 |
| Агалзидаза-бета | Почка | NC | NC | NC |
| THUSISHAUSU OCIU | Селезенка | 1948878,4 | 13040,5 | 134,4 |

*NC: не обнаружено. AUC_{last} означает площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени в диапазоне от нулевой отметки до последней временной точки. C_{max} означает максимальную концентрацию в плазме крови. MRT_{last} означает среднее время удержания.

Приведенные выше экспериментальные результаты означают, что слитый белок альфа-галактозидаза-Fc может сохраняться в течение длительного периода времени, демонстрируя при этом высокую степень распределения в почки, что указывает на то, что непрерывное и долгосрочное воздействие фермента после доставки слитого белка альфа-галактозидаза-Fc в ткани организма может оказывать превосходные терапевтические эффекты на основные органы, поражаемые болезнью Фабри.

Пример 3. Исследование *in vivo* эффективности введения слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc)

Чтобы оценить эффективность слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc) после введения мышам с нокаутом гена альфа-галактозидазы, готовили 4 группы мышей. Первая группа включала мышей дикого типа (WT) (n = 6), которым вводили разбавитель для слитого белка альфа-галактозидаза-Fc. Вторую часть из оставшихся групп составляют экспериментальные группы мышей с нокаутом гена альфа-галактозидазы (мыши с болезнью Фабри; n = 7); группа 2 с введением разбавителя для слитого белка альфа-галактозидаза-Fc; группа 3 с введением агалзидазы-бета (1,0 мг/кг; один раз каждые 2 недели, внутривенно); и группа 4 с введением слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (2,0 мг/кг; один раз каждые 4 недели, подкожно). Через 20 недель введения измеряли содержание нейтральных гликосфинголипидов и лизо-Gb3 (глоботриаозилцерамида) в почках и измеряли количество белка в почечной ткани для коррекции содержания лизо-Gb3.

Чтобы измерить содержание лизо-Gb3 в почечной ткани, проводили предварительную обработку супернатанта гомогената ткани почки, затем выполняли количественное определение и сравнение с использованием тандемного масс-спектрометра в сочетании с жидкостной хроматографией. Чтобы сравнить статистическую значимость между получавшей разбавитель группой (контрольной группой) и экспериментальными группами, проводили статистический анализ, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) (***p < 0,001).

В результате измерения содержания лизо-Gb3, как показано на ФИГ. 2, было подтверждено, что группа, получавшая слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, показала значительное снижение количества лизо-Gb3 в почечной ткани после многократного введения в течение 20 недель. Снижение содержания лизо-Gb3 подтверждает, что слитый белок может оказывать терапевтический эффект в отношении заболеваний, вызванных накоплением лизо-Gb3.

Пример 4. Исследование противовоспалительного действия слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc)

Исследовали эффект ослабления воспаления после введения в течение 20 недель слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc). С этой целью исследовали уровни мРНК для маркеров воспаления TNF-α, IL-6 и RANTES, используя ткани почек нормальных мышей и мышей с болезнью Фабри (с многократным введением в течение

20 недель), которых использовали в примере 3. Подробно, из ткани почек выделяли РНК, используя набор для экстракции РНК (Qiagen), затем синтезировали кДНК, используя набор для синтеза кДНК, и проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), применяя синтезированную кДНК. При проведении ОТ-ПЦР использовали приведенные ниже специфические праймеры.

Таблица 4

| Маркеры воспаления | Последовательность праймера | SEQ ID NO. |
|-----------------------|---|------------|
| TNF-α | Прямой: 5'- GATCTCAAAGACAACCAACATGTG -3' | 15 |
| | Обратн.: 5'- CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG -3' | 16 |
| IL-6 | Прямой: 5'- CCAGTTGCCTTCTTGGGACT -3' | 17 |
| | Обратн.: 5'~ GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC -3' | 18 |
| RANTES | Прямой: 5'- CCTCACCATATGGCTCGGAC -3' | 19 |
| | Обратн.: 5'- ACGACTGCAAGATTGGAGCA -3' | 20 |
| 18s | Прямой: 5'- TAACGAACGAGACTCTGGCAT -3' | 21 |
| | Обрати.: 5'- CGGACATCTAAGGGCATCACAG -3' | 22 |

Помимо этого, в образцах сыворотки крови, взятых при сборе крови, измеряли уровни в крови TNFR1, который является маркером воспаления, и количественное определение выполняли, используя ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ) набор для определения TNFR1 (R&D Systems) согласно инструкциям производителя. Чтобы сравнить статистическую значимость между получавшей разбавитель группой (контрольной группой) и экспериментальными группами, проводили статистический анализ, используя однофакторный ANOVA (* \sim ***p < 0,05 \sim 0,001) или непарный t-критерий (# \sim ### p <0,05 \sim 0,001).

В результате было подтверждено, что при многократном введении слитого белка альфа-галактозидаза-Fc в течение 20 недель, усиленное воспаление ткани почек в контрольной группе мышей с нокаутом гена альфа-галактозидазы значительно ослаблялось (ФИГ. 3).

Пример 5. Исследование ослабляющего фиброз действия слитого белка альфа-галактозидаза-Fc (α-галактозидаза-Fc)

С учетом ослабляющего воспаление действия, подтвержденного в примере 4, оценивали эффект предотвращения фиброза почек при болезни Фабри под действием слитого белка альфа-галактозидаза-Fc. С этой целью исследовали уровни мРНК для маркеров фиброза ТІМР-1, коллагена 1 типа а1 и а-SMA (альфа-актина гладких мышц), используя ткани почек нормальных мышей и мышей с болезнью Фабри (с многократным введением в течение 20 недель), которых использовали в примере 3. Подробно, из ткани почек выделяли РНК, используя набор для экстракции РНК (Qiagen), затем синтезировали кДНК, используя набор для синтеза кДНК, и проводили ОТ-ПЦР, применяя синтезированную кДНК. При проведении ОТ-ПЦР использовали приведенные ниже специфические праймеры.

Таблица 5

| Маркеры фиброза | Последовательность праймера | SEQ ID NO. |
|---------------------|---|------------|
| TIMP-1 | Прямой: 5'- CCTTGCAAACTGGAGAGTGACA -3' | 23 |
| | Обрати.: 5'- AGGCAAAGTGATCGCTCTGGT -3' | 24 |
| Коллаген 1 типа α-1 | Прямой: 5'- CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC -3' | 25 |
| | Обрати.: 5'- AGAGCATGACCGATGGATTC -3' | 26 |
| α-SMA | Прямой: 5'- GTGACATCGACATCAGGAAAGA -3' | 27 |
| | Обрати.: 5'- GATCCACATCTGCTGGAAGG -3' | 28 |
| 18s | Прямой: 5'- TAACGAACGAGACTCTGGCAT -3' | 29 |
| | Обрати.: 5'- CGGACATCTAAGGGCATCACAG -3' | 30 |

Помимо этого измеряли содержание растворимого коллагена и нерастворимого коллагена в тканях почек и выполняли количественное определение в соответствии с инструкциями к набору для анализа коллагена (Biocolor). Чтобы сравнить статистическую значимость между получавшей разбавитель группой (контрольной группой) и экспериментальными группами, проводили статистический анализ, используя однофакторный ANOVA (* \sim ***p < 0,05 \sim 0,001).

В результате было подтверждено, что при многократном введении слитого белка альфа-галактозидаза-Fc наблюдали превосходную эффективность с точки зрения предупреждения и лечения фиброза почечной ткани по сравнению с получавшей разбавитель контрольной группой и группой, которой вводили агалзидазу-бета, при этом, как известно, агалзидаза-бета представляет собой терапевтический агент для лечения болезни Фабри (ФИГ. 4).

Приведенные выше экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что слитый белок альфа-галактозидаза-Fc, представляющий собой слитый с ферментом белок по настоящему изобретению, оказывает превосходные эффекты в плане ослабления воспаления и фиброза почек, которые вызваны или связаны с болезнью Фабри, вследствие большой продолжительности его пребывания в тканях и способности к направленному воздействию в этих тканях.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения почечных заболеваний, вызванных или связанных с болезнью Фабри, при этом фармацевтическая композиция содержит слитый с ферментом белок, представленный приведенной ниже химической формулой 1:

Химическая формула 1

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

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

F представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области иммуноглобулина;

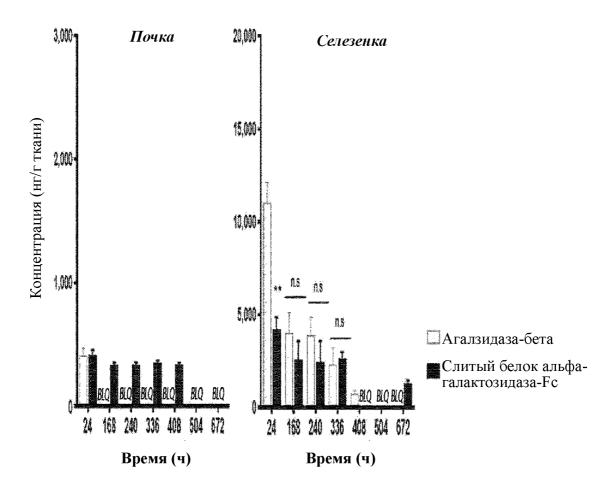
представляет собой ковалентную связь; и

: представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

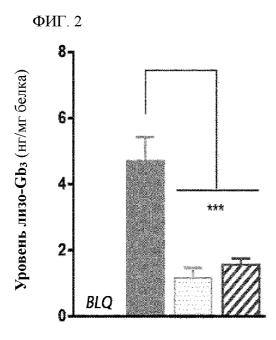
- **2.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где фермент представляет собой антипараллельный димер, образованный X и X'.
- **3.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина является негликозилированной.
- **4.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.
- **5.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина имеет замену аминокислоты в положении 2 на пролин; замену аминокислоты в положении 71 на глутамин; или замену аминокислоты в положении 2 на пролин и замену аминокислоты в положении 71 на глутамин в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.
- **6.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где линкер представляет собой пептидный линкер, состоящий из аминокислот числом от 1 до 100 аминокислот.
- 7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности [GS]x, [GGGS]x или [GGGGS]x, где x равно натуральному числу от 1 до 20.
- **8.** Фармацевтическая композиция по п. 7, где пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

- **9.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где почечные заболевания представляют собой одно или несколько заболеваний, выбранных из группы, состоящей из нефрита, гломерулонефрита, нефротического синдрома, нефропиелита, фиброза почек, хронического заболевания почек, почечной недостаточности и нарушения функции почек.
- **10.** Фармацевтическая композиция по п. 9, где фиброз почек включает нефрогенный системный фиброз (NSF) или кистозный фиброз.
- **11.** Фармацевтическая композиция по п. 9, где фармацевтическая композиция проявляет одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик у индивида, которому вводят данную фармацевтическую композицию:
- (1) сниженный уровень лизо-Gb3 или Gb3 (глоботриаозилцерамида) в почечной ткани;
- (2) сниженный уровень TIMP-1 (тканевого ингибитора металлопротеиназы-1) в почечной ткани;
 - (3) сниженный уровень коллагена 1 типа α1 в почечной ткани;
- (4) сниженный уровень α -SMA (альфа-актина гладких мышц) в почечной ткани; и
- (5) сниженный уровень растворимого коллагена и нерастворимого коллагена в почечной ткани.
- **12.** Фармацевтическая композиция по п. 9, где фиброз почек связан с воспалением или вызван воспалением.
- **13.** Фармацевтическая композиция по п. 9, где фармацевтическая композиция проявляет одну или более чем одну из приведенных ниже характеристик у индивида, которому вводят данную фармацевтическую композицию:
- (1) сниженный уровень фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) в почечной ткани;
 - (2) сниженный уровень интерлейкина-6 (ІL-6) в почечной ткани;
- (3) сниженный уровень хемокина, регулируемого при активации, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками (RANTES), в почечной ткани; и
 - (4) сниженный уровень рецептора 1 TNF (TNFR1) в крови.

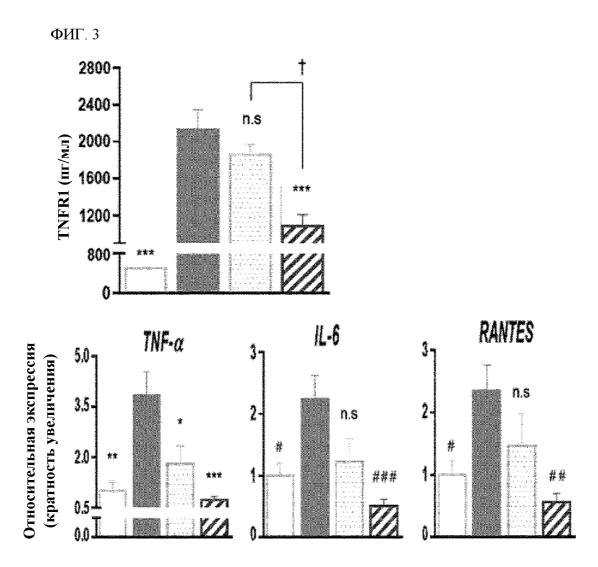
- **14.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где способность к направленному действию в тканях почек у слитого с ферментом белка повышена по сравнению с таковой у фермента, не являющегося слитым белком.
- **15.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где частота введения слитого с ферментом белка индивиду, нуждающемуся в этом, снижена по сравнению с таковой для фермента, не являющегося слитым белком.
- **16.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармацевтическую композицию вводят индивиду один раз каждые две недели или один раз в месяц.
- **17.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где слитый с ферментом белок содержит мономер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.
- **18.** Фармацевтическая композиция по п. 1, где X и X' представляют собой ферменты, каждый из которых содержит одинаковую аминокислотную последовательность или отличающиеся друг от друга последовательности.



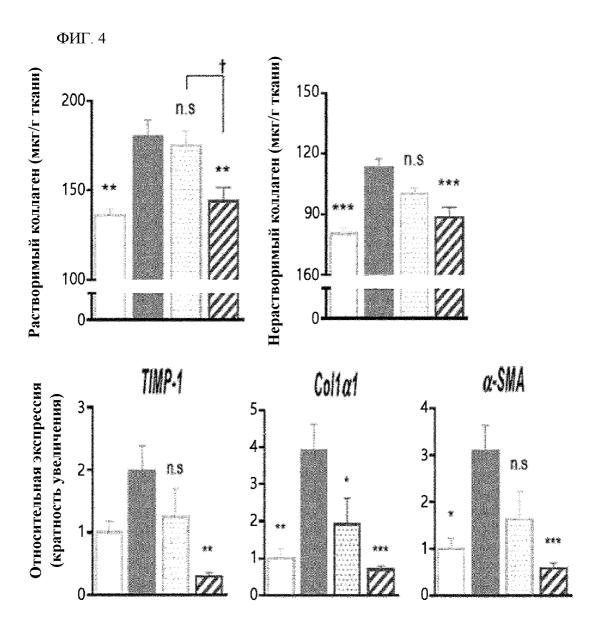
BLQ = ниже предела количественного определения.



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



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



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