



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104662150 B

(45)授权公告日 2018.07.10

(21)申请号 201380048133.X

(22)申请日 2013.07.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104662150 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(30)优先权数据

61/677,959 2012.07.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.03.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/052939 2013.07.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/022515 EN 2014.02.06

(73)专利权人 比奥阿赛斯技术有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 蒂莫西·Z·维塔利斯

瑞恩哈德·加巴斯勒尔

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12N 9/16(2006.01)

A61K 38/46(2006.01)

A61K 47/64(2017.01)

(56)对比文件

Millat G et al.IDS transfer from overexpressing cells to IDS-deficient cells.《Exp Cell Res》.1997,第230卷(第2期),

Millat G et al.IDS transfer from overexpressing cells to IDS-deficient cells.《Exp Cell Res》.1997,第230卷(第2期),

Froissart R et al.Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts.《Biochem J》.1995,第309卷(第2期),

Froissart R et al.Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts.《Biochem J》.1995,第309卷(第2期),

审查员 蔡玉品

权利要求书1页 说明书43页

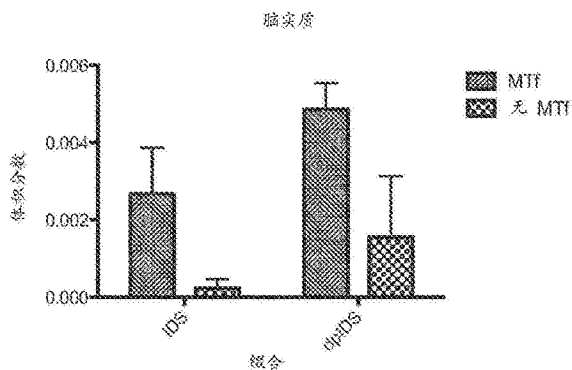
序列表18页 附图6页

(54)发明名称

脱磷酸化的溶酶体贮积症蛋白及其使用方法

(57)摘要

本申请提供了基本上脱磷酸化的形式的溶酶体贮积症(LSD)蛋白及其p97缀合物,所述脱磷酸化的形式的溶酶体贮积症(LSD)蛋白相对于磷酸化形式的蛋白具有增强的穿过或渗透血脑屏障(BBB)的能力,并包括脱磷酸化的形式的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS或I2D)和艾杜糖醛酸酶(IDU)。本申请还提供了包含此类脱磷酸化的LSD蛋白和p97缀合物的组合物,和使用所述组合物例如治疗任何一种或多种溶酶体贮积症(诸如亨特氏综合征(或II型MPS))的方法。



1. 产生脱磷酸化的人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 (IDS) 的方法, 所述方法包括在人 HT-1080 纤维肉瘤细胞系中重组产生人 IDS, 并且用磷酸酶处理重组产生的人 IDS 足够长的时间, 从而相对于相同的人细胞系中产生的未处理的人 IDS, 将人 IDS 的甘露糖-6-磷酸 (M6P) 含量减少至少 50%。

2. 如权利要求 1 中所述的方法, 其中所述 IDS 由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成。

3. 如权利要求 1 中所述的方法, 其中所述磷酸酶为牛小肠碱性磷酸酶 (CIP)。

4. 如权利要求 3 中所述的方法, 其中所述 CIP 与丙烯酸珠结合。

5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中所述人 IDS 与人 p97 序列融合。

6. 权利要求 1-4 中任一项所述的方法, 还包括将所述 IDS 与人 p97 多肽缀合。

7. 分离的重组人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 (IDS) 多肽在制备用于治疗 II 型粘多糖贮积症 (亨特氏综合征) 的药物中的用途, 其中人 IDS 多肽由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列组成, 其中所述 IDS 多肽的甘露糖-6-磷酸 (M6P) 含量小于 $1.2 \text{ pmol M6P/pmol IDS 蛋白}$, 并且其中所述 IDS 多肽具有 7 个或 8 个 N 连接的低聚甘露糖聚糖。

8. 如权利要求 7 中所述的用途, 其中所述 M6P 含量小于 $0.5 \text{ pmol M6P/pmol IDS 蛋白}$ 。

9. 如权利要求 7 中所述的用途, 其中所述 M6P 含量为或小于 $0.15 \text{ pmol M6P/pmol IDS 蛋白}$ 。

10. 缀合物在制备用于治疗 II 型粘多糖贮积症 (亨特氏综合征) 的药物中的用途, 所述缀合物包含 p97 多肽和权利要求 7-9 任一项中所述的脱磷酸化的人 IDS 多肽, 所述 p97 多肽共价地或可操作地连接于所述脱磷酸化的人 IDS 多肽, 从而形成 p97 缀合物。

11. 如权利要求 7-10 中任一项所述的用途, 其中所述亨特氏综合征累及中枢神经系统 (CNS), 或处于发展为累及 CNS 的 LSD 的风险。

脱磷酸化的溶酶体贮积症蛋白及其使用方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.119(e)要求2012年7月31日提交的美国临时申请第61/677,959号的优先权,通过引用将本申请的全文并入。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 本申请相关的序列表是以文本形式代替纸件形式提供的,并通过引用并入本说明书。含有该序列表的文本文件的名称是BIOS_06_01W0_ST25.txt。该文本文件的大小为约25KB,其创建于2013年7月31日,并通过EFS-Web以电子形式提交。

[0005] 发明背景

技术领域

[0006] 本发明大体上涉及脱磷酸化形式的溶酶体贮积症(LSD)蛋白及其p97缀合物,所述脱磷酸化的形式的溶酶体贮积症(LSD)蛋白相对于磷酸化形式的蛋白具有增强的穿过或渗透血脑屏障(BBB)的能力,并包括脱磷酸化形式的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS或ID2)。还包括包含此类脱磷酸化的LSD蛋白和p97缀合物的组合物,和使用所述组合物例如治疗任何一种或多种溶酶体贮积症(诸如亨特氏综合征(或II型MPS))的方法。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 溶酶体贮积症(LSD)源于细胞溶酶体中特定酶或蛋白缺失或活性降低。在细胞内,缺失酶的效应可以看到为细胞内溶酶体中未降解的“贮积物质”的积聚。这种积聚引起溶酶体膨胀和功能失常,导致细胞和组织损伤。由于溶酶体贮积症通常具有遗传病因,许多组织会缺乏上述的酶。然而,不同的组织经受相同酶的缺失是有差异性的。组织受影响的不利程度,某种程度上,取决于组织生成缺失酶的底物的程度。相应地,贮积负荷最重的组织类型决定了药物应如何对患者给药。

[0009] 已鉴定大量溶酶体贮积症酶并且将它们与其分别的疾病建立起关联。一旦鉴定了缺失的或不足的酶,治疗就可以专注于有效地递送替代酶到患者受影响的组织的问题。

[0010] 静脉内酶替代疗法(ERT)对LSD(例如MPS I、MPS II、MPS III)有利;然而,增强治疗性酶递送到此类疾病中的溶酶体的手段在降低成本和提高疗效方面是有利的。

[0011] 作为一个问题,血脑屏障(BBB)阻断许多药剂从血液向大脑的自由转运。由于这个原因,无法期望与重大的神经病学方面相关的LSD对静脉内ERT响应。对此类疾病而言,改善酶穿过BBB的递送并且到达受影响的细胞的溶酶体的方法是相当理想的。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的实施方案包括分离的溶酶体贮积症(LSD)多肽,其相对于哺乳动物细胞(诸如人细胞)中所表达(或产生)的对应的对照LSD蛋白,为基本上脱磷酸化的。在某些实施方案中,相对于对应的LSD蛋白,LSD多肽为至少约75%、80%、90%、95%、98%、99%或100%脱磷酸化的。

[0014] 在具体实施方案中,LSD多肽包含一个或多个N-连接的低聚甘露糖聚糖。例如,某些LSD多肽包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个N连接的低聚甘露

糖聚糖。在一些实施方案中,按照对应的LSD蛋白,LSD多肽具有至少约75%、80%、90%、95%、98%、99%或100%数目或量的N连接的低聚甘露糖聚糖。在具体实施方案中,相对于哺乳动物细胞中表达(或产生)的对应的LSD蛋白,LSD多肽基本上没有N连接的低聚甘露糖聚糖的甘露糖-6-磷酸(M6P)残基。在一些方面,通过酸性磷酸酶或碱性磷酸酶的酶消化将LSD多肽脱磷酸化。

[0015] 在某些实施方案中,LSD多肽选自以下中的一个或多个:艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、L-艾杜糖醛酸酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、酸性脂酶、半胱氨酸转运蛋白、Lamp-2、 α -半乳糖苷酶A、酸性酰胺酶、 α -L-岩藻糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶A、GM2-神经节苷脂激活剂(GM2A)、 α -D-甘露糖酶、 β -D-甘露糖酶、芳基硫酸酯酶A、saposin B、神经氨酸苷酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶磷酸转移酶、磷酸转移酶 γ -亚基、类肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰辅酶A:N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、半乳糖6-硫酸酯酶、 β -半乳糖苷酶、N-乙酰氨基半乳糖4-硫酸酯酶、透明质酸氨基葡萄糖苷酶、硫酸酯酶、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶I、酸性鞘磷酸酯酶、组织蛋白酶A、组织蛋白酶K、 α -半乳糖苷酶B、NPC1、NPC2、sialin、唾液酸转运蛋白,并且包括以上的活性片段和变体。在一些实施方案中,LSD多肽为人多肽。

[0016] 在一些实施方案中,LSD多肽为人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS),或其活性片段或变体。在一些方面,人IDS具有与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:2,本质上由SEQ ID NO:2组成,或由SEQ ID NO:2组成的氨基酸序列。在一些方面,人IDS包含一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖。在具体实施方案中,人IDS包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个N连接的低聚甘露糖聚糖。在一些方面,按照哺乳动物细胞(诸如人细胞(例如HT-1080细胞))中产生的(表达的)对应的野生型人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶,人IDS具有至少约75%、80%、90%、95%、98%、99%或100%数目或量的N连接的低聚甘露糖聚糖。在一些实施方案中,相对于哺乳动物细胞(诸如人细胞)中产生的(表达的)对应的人IDS的N连接的低聚甘露糖聚糖,一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖为基本上脱磷酸化的。在一些方面,一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖为至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%脱磷酸化的。

[0017] 在一些实施方案中,相对于哺乳动物细胞中产生的对应的IDS,人IDS基本上没有N连接的甘露糖-6-磷酸(M6P)残基。在具体的方面,人IDS的M6P含量小于约1.2pmol M6P/pmol IDS蛋白。在某些方面,人IDS的M6P含量小于约0.5pmol M6P/pmol IDS蛋白。在具体方面,人IDS的M6P含量小于约0.15pmol M6P/pmol IDS蛋白。

[0018] 在一些实施方案中,LSD多肽为人 α -L-艾杜糖醛酸酶(IDU),或其活性片段或变体。在一些方面,人IDU具有与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:3,本质上由SEQ ID NO:3组成,或由SEQ ID NO:3组成的氨基酸序列。在一些方面,人IDU包含一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖。在具体方面,人IDU包含1个、2个、3个、4个、5个或6个N连接的低聚甘露糖聚糖。在一些实施方案中,按照哺乳动物细胞(任选地人细胞)中产生的(表达的)对应的人IDU,人IDU具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%数目或量的N连接的低聚甘露糖聚糖。在具体方面,相对于哺乳动物细胞(任选地人细胞)中产生的(表达的)对应的人IDU的N连接的低聚甘露糖聚糖,一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖为基本上脱磷酸化的。在具体方面,一个或

多个N连接的低聚甘露糖聚糖为至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%脱磷酸化的。在一些方面,相对于哺乳动物细胞中产生的对应的IDU,人IDU基本上没有甘露糖-6-磷酸(M6P)残基。

[0019] 在某些实施方案中,对应的蛋白为野生型蛋白,诸如人野生型IDS或IDS蛋白。在具体实施方案中,基本上脱磷酸化的IDS的对应的蛋白为人细胞系(任选地HT-1080纤维肉瘤细胞系)中产生的艾杜硫酸酯酶。

[0020] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞选自CHO细胞,HEK293细胞、HeLa细胞和HT-1080纤维肉瘤细胞。

[0021] 本申请还包括缀合物,其包含p97多肽和本文所述的基本上脱磷酸化的LSD多肽,所述p97多肽共价地或可操作地连接于所述基本上脱磷酸化的LSD多肽,从而形成p97缀合物。

[0022] 本申请还包括组合物(包括药物组合物),所述组合物包含本文所述的分离的溶酶体贮积症(LSD)多肽或p97缀合物。在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受的载体。

[0023] 某些实施方案包括治疗有需要的个体的溶酶体贮积症(LSD)的方法,所述方法包括向个体给予本文所述的组合物(例如药物组合物)、基本上脱磷酸化的LSD蛋白、或缀合物。

[0024] 在某些方法中,LSD选自以下中的一种或多种:II型粘多糖贮积症(亨特氏综合征)、I型粘多糖贮积症(贺勒氏综合征)、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆甾醇酯贮积症、沃尔曼病、胱氨酸症、Danon病、法布瑞氏症、法伯脂肪肉芽肿病、法伯症、岩藻糖苷贮积症、I/II型半乳糖唾液酸贮积症、I/II/III型戈谢病、戈谢病、球形细胞脑白质病、克拉伯病、糖原贮积症II、蓬佩病、I/II/III型GM1-神经节苷脂贮积症、I型GM2-神经节苷脂贮积症、戴萨克斯症、II型GM2-神经节苷脂贮积症、山德霍夫氏病、GM2-神经节苷脂贮积症、I/II型 α -甘露糖贮积症、 β -甘露糖贮积症、异染性脑白质病、I型粘脂贮积症、I/II型唾液酸贮积症、II/III型粘脂贮积症、I型细胞病、IIIC型粘脂贮积症、假胡尔勒氏多种营养不良、IIIA型粘多糖贮积症、沙佩立波综合征、IIIB型粘多糖贮积症、IIIC型粘多糖贮积症、IIID型粘多糖贮积症、IVA型粘多糖贮积症、莫基奥综合征、IVB型粘多糖贮积症、VI型粘多糖贮积症、VII型粘多糖贮积症、Sly综合征、IX型粘多糖贮积症、多种硫酸酯酶缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症、CLN1贝敦氏症、NB型尼曼匹克病、尼曼匹克病、C1型尼曼匹克病、C2型尼曼匹克病、致密性成骨不全症、I/II型辛德勒病、辛德勒病,和唾液酸贮积症。

[0025] 在具体的实施方案中,LSD为II型粘多糖贮积症(亨特氏综合征),并且基本上脱磷酸化的LSD蛋白为人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶。

[0026] 在其他实施方案中,LSD为I型粘多糖贮积症(贺勒氏综合征),并且基本上脱磷酸化的LSD蛋白为人L-艾杜糖醛酸酶。

[0027] 在一些实施方案中,LSD累及中枢神经系统(CNS),或个体处于发展为累及CNS的LSD的风险中。

[0028] 本申请还包括产生基本上脱磷酸化的LSD蛋白(诸如人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS))的方法,所述方法包括在哺乳动物细胞系(任选地人细胞系)中重组产生LSD蛋白,并且用磷酸酶处理重组产生的LSD蛋白足够长的时间,从而相对于相同的细胞系中产生的未处理的LSD蛋白,将LSD蛋白的甘露糖-6-磷酸(M6P)含量减少至少约50%、60%、70%、80%、

90%、95%、98%或99%。在具体的实施方案中,LSD蛋白为人IDS或人IDU。

[0029] 在具体的实施方案中,人细胞系为HT-1080纤维肉瘤细胞系,并且蛋白为人IDS。在一些方面,人IDS包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在具体的方面,磷酸酶为牛小肠碱性磷酸酶(CIP)。在具体的方面,CIP与丙烯酸珠结合。

[0030] 在一些实施方案中,LSD蛋白(诸如人IDS)与人p97序列融合。某些方法还包括将LSD蛋白(诸如人IDS)与人p97多肽缀合。

[0031] 具体的实施方案包括分离的人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)多肽,其中人IDS多肽包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其变体或由SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其变体组成,并且其中甘露糖-6-磷酸(M6P)含量小于约1.2pmol M6P/pmol IDS蛋白。在具体的方面,M6P含量小于约0.5pmol M6P/pmol IDS蛋白。在一些方面,M6P含量约为或小于约0.15pmol M6P/pmol IDS蛋白。

[0032] 参考下文的详细描述和附图,本发明的这些及其他的方面将会变得明晰。在此将本文所公开的所有文献通过引用全文并入,如同将每一篇单独并入一样。

[0033] 附图简述

[0034] 图1显示了静脉内注射后(IDS:艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶;dpIDS:脱磷酸化的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶;MTf-IDS、p97-IDS缀合物;MTf-dpIDS:p97-dpIDS缀合物),小鼠的脑实质中积聚的受试蛋白的水平。

[0035] 图2显示了静脉内感染后,小鼠的脑实质(BBB内)和脑毛细血管(BBB外)之间受试蛋白的分布。

[0036] 图3显示了N连接的聚糖的三种类型:低聚甘露糖聚糖,其中只有甘露糖残基连接于核心;复合聚糖,其中N-乙酰葡萄糖氨基转移酶(GlcNAcTs)连接于核心;和杂合聚糖,其中只有甘露糖残基连接于核心的Man α 1-6臂并且一个或两个分支在Man α 1-3臂上。

[0037] 图4示例了溶酶体蛋白的产生,其需要顺式高尔基体中低聚甘露糖N-聚糖上甘露糖残基的C-6处的GlcNAc-1-P;通过糖苷酶将N-乙酰基-葡萄糖胺从反式高尔基体中移除从而暴露磷酸酯残基。

[0038] 图5显示了脑实质中IDS和dpIDS的分布,没有或没有与p97(MTf)缀合。

[0039] 图6显示了艾杜硫酸酯酶(人IDS)的氨基酸序列(SEQ ID NO:2),并且指示N连接的糖基化位点。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明的实施方案部分地基于下述发现:相对于正常磷酸化的蛋白,脱磷酸化的形式的溶酶体贮积症(LSD)蛋白(诸如艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS))具有显著地增加的转运穿过血脑屏障(BBB)并且进入中枢神经系统(CNS)组织的能力。与p97(黑素转铁蛋白)多肽序列的缀合可以进一步地提高脱磷酸化的LSD蛋白穿过BBB并且进入CNS组织的转运。

[0042] 许多溶酶体酶通过涉及产生磷酸化的N聚糖的专门运输途径而靶向于溶酶体。磷酸化步骤通常发生在顺式高尔基体中并且涉及GlcNAc-1-P向低聚甘露糖N连接的聚糖的甘露糖残基的C-6的转移。反式高尔基体中糖苷酶移除N-乙酰葡萄糖胺从而产生甘露糖-6-磷酸残基。此类残基被凝集素受体(甘露糖-6-磷酸受体)识别,凝集素受体运输溶酶体酶到酸化室,在酸化室中此类残基从受体释放并且最终终止在溶酶体中。在这里,出乎意料地发现从低聚甘露糖N连接的聚糖的移除磷酸基(例如通过与酸性磷酸酶孵育)能增加转运穿过BBB、

但仍然允许向中枢神经系统的细胞内溶酶体室的充分运输,从而改变诸如艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的LSD蛋白的药代动力学。

[0043] 因此,本文所述的脱磷酸化的LSD蛋白和相关的p97缀合物可以在通过酶替代疗法(ERT)对溶酶体贮积症(LSD)的改进治疗中找到多种用途,所述溶酶体贮积症包括但不限于具有中枢系统或CNS组分或处于具有中枢系统或CNS组分的风险的LSD。在具体的实施方案中,LSD蛋白为基本上脱磷酸化形式的IDS,其任选地与人p97多肽缀合,例如其可以用于相对于使用正常磷酸化的蛋白的ERT,改善亨特氏综合征的治疗。在其他实施方案中,LSD蛋白为基本上脱磷酸化形式的IDU,其任选地与人p97多肽缀合,例如其相对于使用正常磷酸化的蛋白的ERT,可以用于改善贺勒氏综合征的治疗。

[0044] 其他优势和益处对本领域中技术人员是显而易见的。

[0045] 定义

[0046] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属的领域中普通技术人员通常理解的相同的意义。尽管描述了优选的方法和材料,但是与本文所述的相似的或等同的任何方法和材料可以用于本发明的实践和测试。出于本发明的目的,下列术语定义如下。

[0047] 本文所用的冠词“a”和“an”指的是一个或多于一个(即至少一个)冠词的语法对象。例如,“an element”意指一个元件或多于一个元件。

[0048] “约”意指相对于参考数量、水平、数值、数字、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度,数量、水平、数值、数字、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度的改变达到30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%。

[0049] 本文所用的术语“氨基酸”意图指天然存在的和非天然存在的氨基酸以及氨基酸类似物和模拟物。天然存在的氨基酸包括蛋白合成期间利用的20种(L)-氨基酸以及其他氨基酸,例如4-羟脯氨酸,羟赖氨酸,锁链素,异锁链素,同型半胱氨酸,瓜氨酸和鸟氨酸。非天然存在的氨基酸包括,例如,(D)-氨基酸,正亮氨酸,正缬氨酸,对氟苯丙氨酸,乙硫氨基酪氨酸等,它们为本领域中技术人员已知。氨基酸类似物包括天然存在的和非天然存在的氨基酸的修饰形式。此类修饰可以包括,例如,氨基酸上化学基团和部分的取代或置换,或通过氨基酸的衍生化。氨基酸模拟物包括,例如,表现出参考氨基酸的功能相似的特性(诸如电荷和电荷间距特征)的有机结构。例如,模拟精氨酸(Arg或R)的有机结构具有位于相似的分子间距中带正电荷的部分并且具有与天然存在的Arg氨基酸的侧链的ε氨基相同的迁移率程度。模拟物还包括受约束的结构以便维持氨基酸的或氨基酸官能团的最佳的间距和电荷相互作用。本领域技术人员已知或可以确定什么样的结构组成功能等同的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

[0050] 在本说明书全部中,除非上下文另有要求,应理解的是,词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”是指包括所述的步骤或元件或步骤或元件的集合,但不除外任何其他的步骤或元件或步骤或元件的集合。“由…组成”意指包括,并且限于,跟随“由—组成”短语的任何元件。因此,“由…组成”表明所列的元件为必需的或强制的,并且没有其他元件存在。“本质上由…组成”意指包括短语后所列的任何元件,并且限于其他元件不干扰或不贡献于本公开内容中所指明的所列元件的活性或作用。因此,短语“本质上由…组成”表明所列元件为必需的或强制的,但是其他元件是任选的,并且可以存在或

不存在,这取决于它们是否在实质上影响所列元件的活性或作用。

[0051] 术语“缀合物”意指试剂或其他分子(例如具有生物活性的分子)与p97多肽共价地或非共价地附接或连接而形成的实体。缀合多肽的其中一个实例为“融合蛋白”或“融合多肽”,即,通过连接最初编码分别的多肽的两个或更多个编码序列而产生的多肽;连接的编码序列的翻译产生单个融合多肽,通常带有源于分别的多肽中每一个的功能特性。

[0052] 本文所用的术语“功能”和“有功能的”等是指生物学、酶学或治疗性功能。

[0053] 术语“聚糖”指的是通常包括单糖的O-糖苷键的多糖或低聚糖。聚糖可以为单糖残基的同聚物或异聚物,和/或它们可以为直链的或分支的。糖基化包括共翻译反应或翻译后反应,其中聚糖连接于蛋白的官能团。蛋白相关聚糖的实例包括N连接的聚糖、O-连接的聚糖、磷酸聚糖、C连接的聚糖和糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定子。N连接的聚糖连接于天冬酰胺或精氨酸侧链的氮,O连接的聚糖连接于丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、羟赖氨酸或羟脯氨酸侧链的羟基氧。N连接的聚糖具有共同的核心糖序列,Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr,并且分为三种类型:(1)低聚甘露糖,其中只有甘露糖残基连接于核心;(2)复合体,其中通过N-乙酰葡萄糖氨基转移酶(GlcNAcTs)启动的“分支”连接于核心;和(3)杂合体,其中只有甘露糖残基连接于核心的Man α 1-6臂并且一个或两个分支在Man α 1-3臂上(见图3)。图4示例了溶酶体蛋白(例如,LSD蛋白)的产生,其需要顺式高尔基体中低聚甘露糖N-聚糖上甘露糖残基的C-6处的GlcNAc-1-P;通过糖苷酶将N-乙酰基-葡萄糖胺从反式高尔基体中移除,从而暴露甘露糖-6-磷酸残基,甘露糖-6-磷酸残基被甘露糖-6-磷酸受体所识别并且运送到酸化前溶酶体室。

[0054] “同源性”指的是相同的或由保守取代组成的氨基酸的百分比数。可使用序列比较程序(诸如GAP(Deveraux et al.,Nucleic Acids Research.12,387-395,1984))测定同源性,在此通过引用将该文献并入本文。以这种方式,可以通过将缺口插入到比对中来将本文所述的序列与相似的或基本上不同长度的序列进行比较,例如通过GAP所用的比较算法确定缺口。

[0055] “分离的”意指物质基本上或实质上没有在其自然态正常伴随其的组分。例如,本文所用的“分离的肽”或“分离的多肽”等包括肽或多肽分子从它的天然细胞环境以及与细胞的其他组分的关联的体外分离和/或纯化;即其与体内物质没有显著地关联。

[0056] 本文所用的术语“连接”、“连接子”、“连接部分”或“L”指的是可以用于将p97多肽片段与目标试剂分开或将第一试剂与另一试剂分开的连接子,例如其中两种或更多种试剂连接从而形成p97缀合物。连接子可为生理学上稳定的或可包括可释放的连接子,诸如可酶促降解的连接子(例如可蛋白水解裂解的连接子)。在某些方面,连接子可为肽连接子,例如,作为p97融合蛋白的一部分。在一些方面,连接子可为非肽连接子或非蛋白连接子。在一些方面,连接子可为颗粒,诸如纳米颗粒。

[0057] 术语“调节”和“改变”包括通常相对于对照“增加”、“增强”或“刺激”以及“降低”或“减少”通常统计学上显著的或生理学上显著的量或程度。“增加的”、“增强的”或“刺激的”量通常为“统计学上显著的”量,并且可包括是没有组合物(例如缺少本发明的缀合物的多肽)或对照组合物、样品或受试个体所产生的量的1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30或更多倍(例如500、1000倍)(包括所有整数和整数之间的、大于1的小数,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。“降低的”或“减少的”量通常为“统计学上显著的”量,并且可包括没有

组合物或对照组合物所产生的量降低1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%，包括其间的所有整数。作为一个非限制性实例，对照可以比较本文所述的基本上脱磷酸化的(dp)溶酶体贮积蛋白相对于该蛋白的正常磷酸化形式的活性，或比较p97多肽缀合物相对于单独的多肽的活性，所述活性例如是穿过血脑屏障的转运/递送的量或速率，向中枢神经系统组织分布的速率和/或水平，和/或血浆、中枢神经系统组织或任何其他系统的或外周非中枢神经系统组织的C_{max}。本文描述了比较和“统计学上显著的”量的其他实例。

[0058] 在某些实施方案中，组合物中任何给定的多肽(例如基本上脱磷酸化的LSD蛋白，p97缀合物)的“纯度”可以特别地定义。例如，某些组合物可包含至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的多肽，包括其间的所有小数，纯度例如可通过高压液相色谱(HPLC)测量，但不限于此，HPLC是生物化学和分析化学中常用的柱色谱法的熟知形式，用以分离、鉴定和定量化合物。

[0059] 术语“多肽”和“蛋白”和“酶”在本文可互换使用，指的是氨基酸残基的聚合物及其变体和合成类似物。因此，这些术语适用于一个或多个氨基酸残基为合成的、非天然存在的氨基酸(诸如对应的天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物。本文所述的多肽不限定产物的特定长度；因此，肽、寡肽和蛋白都包括在多肽的定义内，并且这些术语在本文可互换地使用，除非另有明确指示。本文所述的多肽也可包含表达后修饰，诸如糖基化、乙酰化、磷酸化等，以及本领域中已知的其他修饰，包括天然存在的和非天然存在的。多肽可为整个蛋白，或整个蛋白的子序列、片段、变体或衍生物。

[0060] “生理学上可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键为在生理条件下与水(即，被水解)发生反应的键。键在水中水解的倾向性不仅取决于连接两个中心原子的键的通常类型，而且取决于连接于这些中心原子的取代基。合适的水解不稳定的或弱的连接包括，但不限于，羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧醚、亚胺、原酸酯、硫酯、硫醇酯、碳酸酯和脲，肽和寡核苷酸。

[0061] “可释放的连接子”包括但不限于生理学上可裂解的连接子和可酶促降解的连接子。因此，“可释放的连接子”为在生理条件下可经自发性水解或通过一些其他机制而裂解(例如酶催化的，酸催化的，碱催化的等)的连接子。例如，“可释放的连接子”可以涉及具有质子的碱提取(例如可电离的氢原子，H_a)作为驱动力的消除反应。出于本文的目的，“可释放的连接子”与“可降解的连接子”是同义的。“可酶促降解的连接子”包括可被一种或多种酶(例如肽酶或蛋白酶)降解的连接子，例如氨基酸序列。在具体的实施方案中，可释放的连接子在pH 7.4、25℃下，例如生理pH、人体温度(例如体内)，具有约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约12小时、约18小时、约24小时、约36小时、约48小时、约72小时或约96小时或更少的半衰期。

[0062] 术语“参照序列”一般指的是与其他序列比较的核酸编码序列或氨基酸序列。本文所述的所有多肽和多核苷酸序列都包括为参照序列，包括按名称所述的那些序列和序列表中所述的那些序列。

[0063] 本文所用的，术语“序列同一性”或例如包含“与…具有50%同一性的序列”，指的是在比较窗中按照逐个核苷酸或逐个氨基酸的方式序列相同的程度。因此，可通过以下方

式计算“序列同一性百分比”：在比较窗中比较两条最佳比对的序列，确定相同的核苷碱基（例如A、T、C、G、I）或相同的氨基酸残基（例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met）在两条序列中存在的位置数从而产生匹配的位置数，将匹配的位置数除以比较窗中总的位置数（即窗口大小），并且将结果乘以100从而产生序列同一性的百分比。本申请包括与本文所述的任意参照序列（例如见序列列表）具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸和多肽，通常其中多肽变体保持参照多肽的至少一种生物学活性。

[0064] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括“参照序列”、“比较窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“高度的同一性”。“参照序列”的长度为至少12个单体单元，但经常为15-18个单体单元，并且常常至少25个单体单元，单体单元包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸中的每一个可包含（1）两个多核苷酸之间相似的序列（即，只是完整的多核苷酸序列的一部分）和（2）两个多核苷酸之间相异的序列，因此通常在“比较窗”中比较两个多核苷酸的序列来鉴定和比较序列相似性的局部区域而进行两个（或更多个）多核苷酸之间的序列比较。“比较窗”指的是至少6个，通常约50个-约100个，更通常约100个-约150个连续位置的构想区段，在比较窗中，在最佳地比对两条序列后，比较序列和相同数目的连续位置的参照序列。比较窗可包含与用于两条序列的最佳比对的参照序列（其不包含添加或缺失）相比约20%或更少的添加或缺失（即缺口）。可通过计算机实现的算法（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA，和TFASTA，Genetics Computer Group，575Science Drive Madison，WI，USA）或通过肉眼检查和通过各种任意所选的方法所产生的最佳比对（即，导致比较窗中最高的同源性百分比）进行用于比对比较窗的最佳序列比对。也可参考BLAST程序家族，例如Altschul et al.，Nucl. Acids Res. 25:3389，1997所公开的。序列分析的详细讨论也可以在Ausubel et al.，“现代分子生物学实验室指南（Current Protocols in Molecular Biology），”John Wiley&Sons Inc，1994-1998，第15章的19.3部分中找到。

[0065] “统计学上显著的”意指偶然发生可能性较低的结果。可以通过本领域中已知的任何方法确定统计学显著性。常用的显著性测定包括p值，其为所观察到的事件发生的频率或可能性，如果无效假设是真的。如果所获得的p值小于显著性水平，则拒绝无效假设。在简单情况下，显著性水平定义为0.05或更小的p值。

[0066] 术语“溶解度”指的是诸如多肽的试剂溶解于液体溶剂并且形成均质溶液的特性。溶解度通常表达为浓度，按照每单位体积的溶剂中溶质的量（溶质（g）/溶剂（kg），g/dL（100mL）、mg/ml等）、摩尔浓度、重量摩尔浓度、摩尔分数或其他相似的浓度描述。可以溶解于每溶剂量的溶质的最大平衡量为该溶质在特定条件下（包括温度，压力，pH和溶剂性质）在该溶剂中的溶解度。在某些实施方案中，在生理pH或其他pH（例如在pH5.0、pH 6.0、pH 7.0或pH 7.4）下测量溶解度。在某些实施方案中，在水或生理缓冲液（诸如PBS或NaCl（有或无NaP））中测量溶解度。在具体的实施方案中，在相对较低的pH（例如pH6.0）和相对较高的盐（例如500mM NaCl和10mM NaP）下测量溶解度。在某些实施方案中，在诸如血液或血清的生物流体（溶剂）中测量溶解度。在某些实施方案中，温度可以为约室温（例如约20、21、22、23、24、25℃）或约体温（~37℃）。在某些实施方案中，在室温或约37℃下，基本上脱磷酸化

的LSD蛋白或p97缀合物具有至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30mg/ml的溶解度。

[0067] 本文所用的“个体”包括表现出症状或处于表现出症状的风险中的任何动物，可以用本发明的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或p97缀合物对其进行治疗或诊断。合适的个体(患者)包括实验动物(诸如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、家畜和牲畜或宠物(诸如猫或狗)。个体还包括非人灵长类动物，并且优选人类患者。在具体实施方案中，个体患有溶酶体贮积症，诸如亨特氏综合征。

[0068] “基本上”或“实质上”意指几乎完全或全部地，例如，某一给定量的约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。在一些方面，例如，相对于哺乳动物细胞(例如人细胞)中所产生的对应的野生型蛋白，溶酶体贮积症蛋白为基本上脱磷酸化的。

[0069] “基本上没有”指的是某一给定量的几乎完全或完全地缺乏，例如某一给定量的小于约30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更小。例如，某些组合物可“基本上没有”细胞蛋白、膜、核酸、内毒素或其他污染物。在一些方面，溶酶体贮积症蛋白“基本上没有”磷酸基团。

[0070] 本文所用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括任何对疾病或状态的症状或病理学的任何期望的效应，并且可甚至包括在被治疗的疾病或状态一个或多个可测量的指征中微小的变化或改善。“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”并不一定表明疾病或状态或其相关的症状的完全根除或治愈。接受治疗的个体为需要该治疗的任何个体。临床改善的示例性指征对本领域中技术人员是显而易见的。

[0071] 术语“野生型”指的是基因或基因产物具有当从天然存在的来源分离时该基因或基因产物的特征。野生型基因或基因产物(例如多肽)为在群体中最为频繁观察到的基因或基因产物并且因此任意设计该基因的“正常型”或“野生型”形式。

[0072] 基本上脱磷酸化的溶酶体贮积症蛋白

[0073] 如上文所述，本发明的实施方案包括基本上脱磷酸化的溶酶体贮积症(LSD)蛋白或与一种或多种溶酶体贮积症相关的溶酶体蛋白。实例包括溶酶体水解酶和其他代谢废物和细胞碎片的溶酶体酶，所述废物和细胞碎片诸如脂质、糖蛋白和粘多糖、跨膜蛋白、可溶非酶蛋白、膜转运蛋白和翻译后修饰酶的蛋白。

[0074] 示例性溶酶体蛋白或LSD蛋白包括艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、L-艾杜糖醛酸酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、酸性脂酶、半胱氨酸转运蛋白、Lamp-2、 α -半乳糖苷酶A、酸性酰胺酶、 α -L-岩藻糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶A、GM2-神经节苷脂激活剂(GM2A)、 α -D-甘露糖酶、 β -D-甘露糖酶、芳基硫酸酯酶A、saposin B、神经氨酸苷酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶磷酸转移酶、磷酸转移酶 γ -亚基、类肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰辅酶A:N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、半乳糖6-硫酸酯酶、 β -半乳糖苷酶、N-乙酰氨基半乳糖4-硫酸酯酶、透明质酸氨基葡萄糖苷酶、硫酸酯酶、棕榈酰蛋白硫酯酶、三肽基肽酶I、酸性鞘磷脂酯酶、组织蛋白酶A、组织蛋白酶K、 α -半乳糖苷酶B、NPC1、NPC2、sialin和唾液酸转运蛋白。在具体的实施方案中，LSD蛋白为人蛋白。

[0075] 在某些实施方案中，相对于对应的对照LSD蛋白，基本上脱磷酸化的LSD蛋白为至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%(即完全

地)脱磷酸化的。

[0076] 在一些实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白基本上没有磷酸基团,例如,LSD蛋白具有对应的对照LSD蛋白的磷酸基团的小于约1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。可以根据本领域中常规技术测量蛋白磷酸化中的改变,诸如用以测量总分子量的SDS-PAGE分析,同位素标记和质谱(见Bonenfant et al.,PNAS USA.100:880-885,2003),使用磷蛋白特异性抗体的蛋白印迹和ELISA,以及使用荧光磷酸化感应染料(见来自Molecular Probes的Pro-QDiamond®染料)的蛋白磷酸化状态的定量分析。

[0077] 对应的“对照”蛋白包括相同类型的蛋白(例如,来自于相同属和/或种类的不同蛋白名称,相同的或几乎相同的氨基酸序列),其重组产生于具有正常或野生型糖基化和磷酸化机制(例如CHO细胞,HEK细胞)的哺乳动物细胞(例如人细胞)中,并且其优选未被例如诸如糖苷酶或磷酸酶的酶处理。在一些方面,对应的对照蛋白为基本上脱磷酸化的LSD蛋白的野生型形式。在具体的实施方案中,例如,当LSD蛋白为艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶时,对应的对照蛋白为人细胞诸如HT-1080人纤维肉瘤细胞系(见Garcia et al.,Mol.Genet.Metab.91:183-90,2007;和图5)中所产生的艾杜硫酸酯酶(Elaprase®)。

[0078] 可以根据本领域中各种技术制备脱磷酸化的LSD蛋白。例如,因为许多磷酸基团与N连接的低聚甘露糖聚糖上的甘露糖-6-磷酸残基相联,因此减少LSD蛋白上的聚糖数量或糖基化程度同样地可以减少磷酸基团的数量或磷酸化的程度。因此,例如通过使与潜在的糖基化位点关联的一个或多个残基(即N连接的糖基化位点中的残基,诸如Asn-X-Ser或Asn-X-Thr,其中X为除了Pro之外的任何氨基酸)突变,通过酶性脱糖基化(例如用肽-N-糖苷酶F(PNGase F)甘露糖苷酶处理),通过控制细胞培养基或细胞培养条件从而抑制N-聚糖加工,和/或通过在哺乳动物、酵母、昆虫、或具有改变的、减少的或没有糖基化能力的其他细胞类型中重组产生LSD蛋白,可以实现聚糖相关的磷酸化的水平降低(例如见Hossler et al.,Glycobiology.19:936-949,2009;和Cummings与Esco et al.,编辑人,Essentials of Glycobiology.第2版.,Cold Spring Harbor Laboratory Press.,2009.,包括第8、46和50章)。具有显著降低的糖基化能力的细胞实例包括许多细菌,诸如大肠杆菌(E.coli)。

[0079] 然而,在某些实施方案中,优选降低LSD蛋白的磷酸化,而不显著地降低其糖基化状态,即,不显著地减少聚糖的数量或量,聚糖包括N连接的低聚甘露糖聚糖。因此,在某些实施方案中,相对于对应的对照蛋白,LSD蛋白为基本上脱磷酸化的,但具有与对照蛋白相同的或基本上相同的聚糖数量或糖基化程度。在具体的实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白与对应的对照蛋白具有相同的或基本上相同的N连接的低聚甘露糖聚糖的数量或程度。实例包括,按照对应的对照蛋白,基本上脱磷酸化的LSD蛋白具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的聚糖(例如N连接的低聚甘露糖聚糖)数量或糖基化程度。可以根据本领域中各种技术测量糖基化状态,诸如用以测量总分子量的SDS-PAGE分析,基于荧光2-D凝胶方法结合用PNGase F(肽:N-糖苷酶F)酶学预处理蛋白和荧光2-D凝胶或2-D凝胶蛋白印迹(见Graham et al.,Proteomics.8:4919-30,2008),和用于定量N连接的糖蛋白的基于质谱的方法(见Rebecchi et al.,Current Proteomics.8:269-277(9),2011)。

[0080] 在这些实施方案和有关的实施方案中,具体的聚糖(例如N连接的低聚甘露糖聚

糖;见图4)可以相对于对应的对照蛋白的聚糖为基本上脱磷酸化的。例如,在某些实施方案中,相对于对应的对照LSD蛋白的聚糖,LSD蛋白的聚糖(例如N连接的低聚甘露糖聚糖)为至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%(即完全地)脱磷酸化的。在一些方面,LSD蛋白的聚糖(例如N连接的低聚甘露糖聚糖)基本上没有磷酸基团,例如具有对应的对照LSD蛋白的聚糖的磷酸基团的小于约1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白基本上没有甘露糖-6-磷酸(M6P)残基,例如,具有对应的对照LSD蛋白的M6P残基的小于约1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

[0081] 在一些实施方案中,可以在哺乳动物或其他细胞中产生糖基化和磷酸化LSD蛋白,然后用一种或多种磷酸酶体外处理所述LSD蛋白以减少磷酸基团(例如与N连接的低聚甘露糖聚糖关联的甘露糖-6-磷酸残基)的数量,任选地,不显著地减少聚糖的数量或糖基化的程度(见实施例1)。磷酸酶的一般实例包括酸性磷酸酶和碱性磷酸酶。酸性磷酸酶的实例包括前列腺酸性磷酸酶,溶酶体酸性磷酸酶,红细胞酸性磷酸酶、巨噬细胞酸性磷酸酶、破骨细胞酸性磷酸酶和马铃薯酸性磷酸酶。常用的碱性磷酸酶的实例包括虾碱性磷酸酶、小牛肠碱性磷酸酶、胎盘碱性磷酸酶和分泌型碱性磷酸酶(即胎盘碱性磷酸酶的C-末端截短形式)。

[0082] 在一些方面,基本上脱磷酸化的LSD蛋白为人艾杜糖醛酸酶(α -L-艾杜糖醛酸酶;IDU)或其活性片段或变体。艾杜糖醛酸酶为参与葡糖氨基聚糖(诸如硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素)降解的溶酶体酶,并且它的缺乏与MPS I或贺勒氏综合征有关。SEQ ID NO:3提供了人艾杜糖醛酸酶的一级氨基酸序列。

[0083] 人IDU具有6个可能的N连接糖基化位点,主要为“复合型”低聚糖,其中至少两个显示为甘露糖-6-磷酸化(见Brooks et al., *Glycobiology*.11:741-750,2001;和Zhao et al., *J. Biol. Chem.*272:22758-22765:1997)。在一些实施方案中,基本上脱磷酸化的人IDU在这些糖基化位点中的一个或多个处具有突变,从而减少了N连接的聚糖和它们关联的甘露糖-6-磷酸残基。因此,在这些实施方案和有关的实施方案中,相对于野生型人IDU蛋白,人IDU蛋白为基本上脱糖基化的(例如,N连接的低聚甘露糖聚糖)和基本上脱磷酸化的。

[0084] 在具体方面,基本上脱磷酸化的LSD蛋白为人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)或其活性片段或变体。IDS(艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶;EC3.1.6.13)为参与葡糖氨基聚糖(诸如硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素)降解的溶酶体外硫酸酯酶。IDS缺乏引起溶酶体贮积症MPS II(II型粘多糖贮积症)。SEQ ID NO:2提供了人IDS(艾杜硫酸酯酶)的一级氨基酸序列。本申请还包括人IDS的糖基化变体(见美国专利5,798,239号和5,932,211号),如本文所述的,其为基本上脱磷酸化的。

[0085] 人IDS序列在第31、115、144、246、280、325、513和537位的包含8个可能的N连接糖基化位点(即NXS/T基序)(见Parkinson-Lawrence et al., *Biochem J.*386:395-400,2005;和图6中SEQ ID NO:2中对应的N连接的糖基化位点)。在一些实施方案中,基本上脱磷酸化的人IDS在这些糖基化位点中的一个或多个处具有突变,从而减少N连接的聚糖和它们关联的甘露糖-6-磷酸残基。因此,在这些和有关的实施方案中,相对于野生型人IDS蛋白,人IDS蛋白为基本上脱糖基化的(例如N连接的低聚甘露糖聚糖)和基本上脱磷酸化的。

[0086] 在其他方面,基本上脱磷酸化的人IDU或IDS蛋白具有与对应的对照人IDS或IDU蛋

白(例如野生型蛋白)相同的或基本上相同的聚糖数量或糖基化程度。例如,基本上脱磷酸化的人IDU或IDS蛋白可以在可能的N连接的糖基化位点中的1、2、3、4、5、6、7或8个处有N连接的聚糖(例如低聚甘露糖聚糖)。因此,按照哺乳动物细胞,任选地人细胞中产生的(表达的)对应的野生型人IDU或IDS,人IDU或IDS蛋白可具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的N连接的低聚甘露糖聚糖的数量或量。在具体方面,相对于对应的对照人IDU或IDS蛋白的N连接的低聚甘露糖聚糖,人IDU或IDS的一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖为基本上脱磷酸化的。例如,相对于对应的对照人IDS蛋白,人IDU或IDS的一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖可以为至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%(即完全地)脱磷酸化的。在一些方面,人IDU或IDS的一个或多个N连接的低聚甘露糖聚糖基本上没有磷酸基团,例如,脱磷酸化的IDU或IDS蛋白的聚糖有小于对应的对照人IDU或IDS蛋白的聚糖的磷酸基团的约1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些实施方案中,基本上脱磷酸化的IDU或IDS蛋白为基本上没有甘露糖-6-磷酸(M6P)残基,例如,具有小于对应的对照IDU或IDS蛋白的M6P残基的约1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在具体的实施方案中,基本上脱磷酸化的IDS蛋白的M6P含量约为或小于约0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5pmol M6P/pmol蛋白,包括上述数值之间的所有范围和整数。

[0087] 在具体的实施方案中,人IDS蛋白为人细胞(例如HT-1080细胞)中产生的艾杜硫酸酯酶(Elaprase®)的脱磷酸化的形式,其被一种或多种磷酸酶(例如酸性磷酸酶,碱性磷酸酶)处理而减少磷酸基团或M6P残基的数量。

[0088] p97多肽序列及其缀合物

[0089] 本发明的实施方案还包括包含人p97(黑素转铁蛋白;MTf)多肽和本文所述的脱磷酸化的LSD蛋白的缀合物、包含此缀合物的组合物及其有关使用方法,所述人p97(黑素转铁蛋白;MTf)多肽结合、连接或附接于本文所述的脱磷酸化的LSD蛋白的缀合物。

[0090] 在具体的实施方案中,p97多肽共价地、非共价地或可操作地结合于脱磷酸化的LSD蛋白,从而形成p97-试剂缀合物。在一些方面,p97缀合物还可以与一种或多种其他感兴趣的试剂进一步结合,诸如小分子和/或可检测的实体。下文描述了示例性p97多肽序列和试剂。还描述了用于p97多肽与脱磷酸化的LSD蛋白或其他感兴趣的试剂结合的示例性方法和组分,诸如连接子基团。

[0091] p97序列。在某些实施方案中,本发明的组合物和/或缀合物中所用的p97多肽序列包含SEQ ID NO:1所示的人p97序列,本质上由SEQ ID NO:1所示的人p97序列组成或由SEQ ID NO:1所示的人p97序列组成。还包括其变体和片段。

[0092] 在一些实施方案中,p97多肽序列包含沿着它的长度与SEQ ID NO:1所示的人p97序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或同源性的序列,或该序列的一部分。

[0093] 在具体的实施方案中,p97多肽序列包含SEQ ID NO:1所示的人p97序列的片段。在某些实施方案中,p97多肽片段的长度约为、至少约为、或最多约为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、

38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730个或更多个氨基酸,包括以上数值之间的所有整数和范围,并且其可包含参照p97序列(诸如SEQ ID NO:1)的序列的全部或一部分。

[0094] 在某些实施方案中,p97多肽片段的长度为约5-700、5-600、5-500、5-400、5-300、5-200、5-100、5-50、5-40、5-30、5-25、5-20、5-15、5-10、10-700、10-600、10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、10-40、10-30、10-25、10-20、10-15、20-700、20-600、20-500、20-400、20-300、20-200、20-100、20-50、20-40、20-30、20-25、30-700、30-600、30-500、30-400、30-300、30-200、30-100、30-50、30-40、40-700、40-600、40-500、40-400、40-300、40-200、40-100、40-50、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、60-700、60-600、60-500、60-400、60-300、60-200、60-100、60-70、70-700、70-600、70-500、70-400、70-300、70-200、70-100、70-80、80-700、80-600、80-500、80-400、80-300、80-200、80-100、80-90、90-700、90-600、90-500、90-400、90-300、90-200、90-100、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-250、100-200、100-150、200-700、200-600、200-500、200-400、200-300或200-250个氨基酸,并且包含参照p97序列(诸如SEQ ID NO:1)的全部或一部分。

[0095] 在某些实施方案中,感兴趣的p97多肽序列包括能有效地运输感兴趣的试剂穿过血脑屏障并且进入到中枢神经系统(CNS)的p97氨基酸序列、子序列和/或p97的变体。在某些实施方案中,变体或片段包含人p97的N臂(SEQ ID NO:1的残基20-361)。在具体的方面,变体或片段包含完整的和功能性Fe³⁺结合位点。

[0096] 在一些实施方案中,p97多肽序列为p97多肽的可溶性形式(见Yang et al., Prot Exp Purif. 34:28-48, 2004),或其片段或变体。在一些方面,可溶性p97多肽具有单独的疏水结构域(SEQ ID NO:1的残基710-738)的全部或部分的缺失,或单独的疏水结构域(SEQ ID NO:1的残基710-738)的全部或部分的缺失与信号肽(SEQ ID NO:1的残基1-19)的全部或部分的缺失的组合。在具体的方面,可溶性p97多肽包含性或由SEQ ID NO:1的残基20-711组成,包括其变体和片段。

[0097] 在某些实施方案中,例如,在利用脂质体的实施方案中,p97多肽序列为p97多肽的脂溶性形式。例如,某些和有关的实施方案包括p97多肽包含疏水结构域的全部或部分,任选地带有或不带有信号肽。

[0098] 在某些其他实施方案中,p97片段或变体能够特异地结合p97受体、LRP1受体和/或LRP1B受体。

[0099] 下文更为详尽地描述了参照p97多肽和其他参照多肽的变体和片段。

[0100] p97缀合物。如上文所示,某些实施方案包含与脱磷酸化的LSD蛋白或其他感兴趣的试剂(例如小分子或可检测的实体)或其任何组合连接的p97多肽。还包括包含多个脱磷酸化的LSD蛋白和感兴趣的试剂的缀合物,例如,与一个或多个脱磷酸化的LSD蛋白和小分子缀合的p97片段。

[0101] 优选共价连接,然而,也可以用非共价连接,包括利用相对强的非共价的蛋白-配体相互作用的连接,诸如生物素与抗生物素蛋白之间的相互作用。还包括可操作的连接,所述可操作的连接未必需要在p97多肽和脱磷酸化的LSD蛋白或感兴趣的试剂之间直接地共价的或非共价的相互作用;此类连接的实例包括包含p97多肽和脱磷酸化的LSD蛋白和任选的额外的感兴趣的试剂的脂质体混合物。本文描述了产生蛋白缀合物的示例性方法,并且其他方法为本领域中熟知的。

[0102] 小分子。在具体的实施方案中,p97缀合物还连接或附接到小分子。“小分子”指的是合成的或生物学来源(生物分子)的有机化合物,但通常不是聚合物。有机化合物指的是两大类分子中包含碳的化学化合物,通常除外只包含碳酸盐,简单的碳氧化物,或氰化物的化合物。“生物分子”通常指的是由活的生物体产生的有机分子,包括大的聚合分子(生物聚合物),诸如肽、多糖和核酸,以及小分子,诸如初级次级代谢产物、脂质、磷脂、糖脂、甾醇类、甘油糖脂、维生素和激素。“聚合物”通常指的是由重复结构单元组成的大分子或巨分子,所述重复结构单元通常通过共价化学键连接。

[0103] 在某些实施方案中,小分子具有小于约1000-2000道尔顿的分子量,通常约300-700道尔顿、并且包括约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或2000道尔顿。

[0104] 对溶酶体贮积症的治疗而言,示例性小分子的种类包括底物减少疗法和药物伴侣蛋白疗法所用的那些小分子,未成熟的无义突变抑制剂和蛋白稳态调节剂(见Smid et al.,Expert Opin.Investig.Drugs.19:1367-79,2010;和Beck,IUBMB Life.62:33-40,2010)。

[0105] 在一些方面,小分子为抗炎分子。实例包括类固醇和糖皮质激素(例如倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、强的松、去炎龙),非甾体类抗炎药(NSAIDS),诸如阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺和霉酚酸酯等。

[0106] 可检测的实体。在一些实施方案中,p97缀合物还连接或附接到“可检测的实体”。示例性可检测的实体包括,但不限于,基于碘的标签、放射性同位素、荧光团/荧光染料和纳米颗粒。

[0107] 示例性基于碘的标签包括泛影酸(Hypaque[®],GE医疗)和它的阴离子形式,泛影酸盐。泛影酸为先进的X射线技术(诸如CT扫描)中所用的造影剂。还包括下文所述的碘放射性同位素。

[0108] 可以用作可检测的实体的示例性放射性同位素包括³²P、³³P、³⁵S、³H、¹⁸F、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹¹¹In、¹⁶⁹Yb、^{99m}Tc、⁵⁵Fe和碘的同位素,诸如¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I和¹³¹I。这些放射性同位素具有不同的半衰期,衰变类型和能量水平,这可以适于匹配具体方案的需求。这些放射性同位素中的某些可以通过与p97多肽缀合而选择性靶向或更好地靶向于CNS组织,例如,从而改善此类组织的医学成像。

[0109] 可以用作直接可检测的实体的荧光团或荧光染料的实例包括荧光素、四甲基若丹明、德克萨斯红、俄勒冈绿[®]和许多其他的荧光团或荧光染料(例如Haugland,Handbook of Fluorescent Probes-第9版,2002,Molec.Probes,Inc.,Eugene OR;Haugland,The

Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-第10版, 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA)。还包括发光的或其他可检测的染料。由染料发射的光可以为可见光或不可见光, 诸如紫外光或红外光。在示例性实施方案中, 染料可为荧光共振能量转移 (FRET) 染料; 氧杂蒽染料, 诸如荧光素和若丹明; 在 α 或 β 位具有氨基的染料 (诸如萘胺染料, 1-二甲基氨基萘-5-磺酸酯, 1-苯胺基-8-亚萘基磺酸酯和2-对甲苯胺基-6-亚萘基磺酸酯); 具有3-苯基-7-异氰酸香豆素的染料; 吖啶, 诸如9-异硫氰基吖啶和吖啶橙; 芘, 苯并二唑和二苯乙烯; 具有3-(ϵ -羧戊烷基)-3'-乙基-5,5'-二甲基氧杂甲花青苷 (CYA); 6-羧基荧光素 (FAM); 5&6-羧基若丹明-110 (R110); 6-羧基若丹明-6G (R6G); N,N',N',N'-四甲基-6-羧基若丹明 (TAMRA); 6-羧基-X-若丹明 (ROX); 6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素 (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; 德克萨斯红和若丹明红; 6-羧基-2',4,7,7'-四氯荧光素 (TET); 6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素 (HEX); 5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素 (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; 和Cy7.5; IR800CW、ICG、Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 680或Alexa Fluor 750。某些实施方案包括与用可检测的实体 (诸如荧光团 (例如**俄勒冈绿®**, Alexa Fluor 488)) 标记的化疗剂 (例如紫杉醇, 阿霉素) 的缀合。

[0110] 纳米颗粒尺寸范围通常在约1-1000nm, 并且包括不同的化学结构, 诸如金和银颗粒以及量子点。当用成角度的入射白光辐照时, 范围在约40-120nm的银或金纳米颗粒能散射高强度的单色光。散射光的波长取决于颗粒的尺寸。非常接近的4-5个不同的颗粒每一个都散射单色光, 当它们叠加时将产生特异的独特的颜色。衍生化的纳米颗粒 (诸如银或金颗粒) 可以连接于很多类型的分子, 包括蛋白、抗体、小分子、受体配体和核酸。纳米颗粒的具体实例包括金属纳米颗粒和金属纳米壳, 诸如金颗粒、银颗粒、铜颗粒、铂颗粒、镉颗粒、复合颗粒、金空心球、包金二氧化硅纳米壳和包二氧化硅金壳。还包括了二氧化硅、乳胶、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯、PVDF纳米颗粒和任何这些材料的有色颗粒。

[0111] 量子点为直径约1-5nm的荧光晶体, 可被大范围波长的光激发。一旦被具有适当波长的光激发, 这些晶体能发射光, 诸如单色光, 其波长取决于它们的化学组成和尺寸。诸如CdSe、ZnSe、InP或InAs的量子点拥有独特的光学特性; 这些量子点和相似的量子点可从大量商业来源获取 (例如NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR; Nanoco Technologies, Manchester, UK; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

[0112] 多肽变体和片段。某些实施方案包括本文所述的参照多肽的变体和/或片段, 参照多肽可以是名称描述或参考序列标识符描述, 包括p97多肽和LSD蛋白。这些多肽的野生型或最普遍的序列在本领域中已知, 并且可以用作与本文所述的变体和片段的比较。

[0113] 本文所用的术语多肽“变体”为本文具体公开的多肽区别通常在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入的多肽。变体多肽具有生物活性, 即, 它们继续拥有参照多肽的酶活性或结合活性。此类变体可源于, 例如遗传多态性和/或人工操作。

[0114] 在许多情况下, 生物活性变体包含一个或多个保守型取代。“保守型取代”为将一个氨基酸取代为另一具有类似特性的氨基酸的取代, 从而肽化学领域的技术人员能预料多肽的二级结构和水学性质不会发生明显改变。如以上所述, 可在本发明的多核苷酸和多肽的结构中进行修饰并且仍然获得编码带有所希望的特征的变体或衍生多肽的功能分子。当

希望改变多肽的氨基酸序列从而产生等同的或甚至改进的本发明的多肽的变体或部分时，本领域中技术人员通常根据以下的表A改变编码DNA序列的密码子中的一个或多个。

[0115]

表 A									
氨基酸			密码子						
甘氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU					
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU					
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG					
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU					
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
组氨酸	His	H	CAC	CAU					
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG					
亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
蛋氨酸	Met	M	AUG						
天冬酰胺	Asn	N	AAC	AAU					
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG					
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
色氨酸	Trp	W	UGG						
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU					

[0116] 例如，在蛋白结构中，某些氨基酸可取代为其他氨基酸而不产生具有诸如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点的结构的可检测出的相互作用结合能力的损失。因为蛋白的相互作用能力和性质限定了蛋白的生物学功能活性，因此可以在蛋白序列和它的基础DNA编码序列中进行一定的氨基酸序列取代，最终仍获得相似特性的蛋白。因此，本文考虑到了可在所公开的组合物肽序列或编码所述的肽的对应的DNA序列中进行各种改变而不产生可检测出的效用的损失。

[0117] 在进行此类改变中，可考虑氨基酸的亲水指数。氨基酸的亲水指数在赋予蛋白相

相互作用的生物功能中的重要性为本领域中所通常理解 (Kyte&Doolittle, 1982, 在此通过引用将其并入本文)。所接受的事实是, 氨基酸的相对亲水特征有助于实现蛋白的二级结构, 其随之又限定了蛋白与其他分子 (例如, 酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等) 的相互作用。基于氨基酸的疏水性和电荷特征, 每一氨基酸已被指定亲水指数 (Kyte&Doolittle, 1982)。这些值为: 异亮氨酸 (+4.5); 缬氨酸 (+4.2); 亮氨酸 (+3.8); 苯丙氨酸 (+2.8); 半胱氨酸 (+2.5); 蛋氨酸 (+1.9); 丙氨酸 (+1.8); 甘氨酸 (-0.4); 苏氨酸 (-0.7); 丝氨酸 (-0.8); 色氨酸 (-0.9); 酪氨酸 (-1.3); 脯氨酸 (-1.6); 组氨酸 (-3.2); 谷氨酸 (-3.5); 谷氨酰胺 (-3.5); 天冬氨酸 (-3.5); 天冬酰胺 (-3.5); 赖氨酸 (-3.9); 精氨酸 (-4.5)。本领域中已知, 某些氨基酸可被具有相似的亲水指数或评分的其他氨基酸取代, 并且仍然能产生具有相似的生物学活性的蛋白, 即, 仍然获得生物学功能性等同的蛋白。在进行此类改变中, 优选亲水指数为 ± 2 以内的氨基酸的取代, 特别优选亲水指数为 ± 1 以内的氨基酸的取代, 甚至更特别优选亲水指数为 ± 0.5 以内的氨基酸的取代。

[0118] 本领域中还应理解, 基于亲水性可有效地进行相似的氨基酸的取代。美国专利 4, 554, 101 (在此通过引用特别地将其全文并入本文) 公开了, 由于受蛋白邻近的氨基酸的亲水性的支配, 蛋白的最大局部平均亲水性与蛋白的生物学特性相关。如在美国专利 4, 554, 101 中详述的, 下列的亲水性值已被分配给氨基酸残基: 精氨酸 (+3.0); 赖氨酸 (+3.0); 天冬氨酸 (+3.0 ± 1); 谷氨酸 (+3.0 ± 1); 丝氨酸 (+0.3); 天冬酰胺 (+0.2); 谷氨酰胺 (+0.2); 甘氨酸 (0); 苏氨酸 (-0.4); 脯氨酸 (-0.5 ± 1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 (-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 蛋氨酸 (-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸 (-1.8); 异亮氨酸 (-1.8); 酪氨酸 (-2.3); 苯丙氨酸 (-2.5); 色氨酸 (-3.4)。应理解的是, 氨基酸可以被取代为具有相似的亲水性值的另一氨基酸, 而仍然获得生物学等同蛋白, 并且尤其是免疫学上等同蛋白。在此类改变中, 优选亲水性值为 ± 2 以内的氨基酸的取代, 特别优选亲水性值为 ± 1 以内的氨基酸的取代, 甚至更特别优选亲水性值为 ± 0.5 以内的氨基酸的取代。

[0119] 如上文所述, 氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性, 例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑上述的各种特征的示例性取代为本领域中技术人员所熟知的并且包括: 精氨酸和赖氨酸; 谷氨酸和天冬氨酸; 丝氨酸和苏氨酸; 谷氨酰胺和天冬酰胺; 以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0120] 氨基酸取代还可基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性。例如, 带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸; 带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸; 具有相似亲水性值的、带有不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸; 甘氨酸和丙氨酸; 天冬酰胺和谷氨酰胺; 以及丝氨酸, 苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可代表保守型改变的其他氨基酸组包括: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 和 (5) phe, tyr, trp, his。

[0121] 变体也可以或可选地含有非保守型改变。在优选的实施方案中, 变体多肽与天然序列的区别在于少于约 10、9、8、7、6、5、4、3、2 个氨基酸或甚至 1 个氨基酸的取代、缺失或添加。变体也可以 (或可选地) 通过例如缺失或添加对多肽的免疫原性、二级结构、酶活性和/或水性的影响很小的氨基酸进行修饰。

[0122] 在某些实施方案中, 多肽序列的长度约为、至少约为或至多约为 5、6、7、8、9、10、

11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000个或更多个连续的氨基酸,包括上述数值之间的所有整数,并且其可包含参照序列(例如见序列表)的全部或一部分。

[0123] 在其他具体的实施方案中,多肽序列由大约或不多于约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000个或更多个连续氨基酸组成,包括上述数值之间的所有整数,并且其可包含参照序列(例如见序列表)的全部或一部分。

[0124] 在其他具体的实施方案中,多肽序列为约10-1000、10-900、10-800、10-700、10-600、10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、10-40、10-30、10-20、20-1000、20-900、20-800、20-700、20-600、20-500、20-400、20-300、20-200、20-100、20-50、20-40、20-30、50-1000、50-900、50-800、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、100-1000、100-900、100-800、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-200、200-1000、200-900、200-800、200-700、200-600、200-500、200-400、或200-300个连续氨基酸,包括上述范围之内的所有范围,并且包含参照序列的全部或一部分。在某些实施方案中,任何参照多肽的C末端或N末端区可截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、或800个或更多个氨基酸,或约10-50、20-50、50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800个或更多个氨基酸,包括上述数值和范围之内的所有数值和范围(例如101、102、103、104、105),只要截短的多肽保留参照多肽的结合特性和/或活性。通常,生物活性片段具有不少于它衍生自的生物活性参照多肽的活性的约1%、约5%、约10%、约25%或约50%。

[0125] 通常,变体表现出与参照多肽序列至少约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的相似性或序列同一性或序列同源性。而且,考虑到了与天然或母体序列的区别在于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸的添加(例如C末端添加,N末端添加或两者)、缺失、截短、插入或取代,并且保留了母体

或参照多肽序列的特性或活性的序列。

[0126] 在一些实施方案中,变体多肽与参照序列的区别在于至少一个、但少于50、40、30、20、15、10、8、6、5、4、3或2个氨基酸残基。在其他的实施方案中,变体多肽与参照序列的区别在于至少1%、但少于20%、15%、10%或5%的残基。(如果该比较需要比对,那么序列应以最大的相似性进行比对。来自缺失或插入的“循环”输出序列或错配被认为是差异。)

[0127] 序列之间的序列相似性或序列同一性(这两个术语在本文可互换地使用)的计算可如下进行。为测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的来比对序列(例如缺口可被引入第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个用于最佳比对,并且可以出于比较的目的无视非同源的序列)。在某些实施方案中,出于比较目的比对的参照序列的长度为参照序列长度的至少30%、优选至少40%、更优选至少50%、60%,甚至更优选至少70%、80%、90%、100%。然后比较对应的氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置与在第二序列中对应的位置被相同的氨基酸残基或核苷酸所占据时,那么这两个分子在该位置处是相同的。

[0128] 考虑需要被引入用于两条序列的最佳比对的缺口数目、每一缺口的长度,两条序列之间同一性百分比为所述序列所共有的相同位置数的函数。

[0129] 使用数学算法可以完成序列的比较和两条序列之间同一性百分比的测定。在优选的实施方案中,使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453,1970)算法测定两条氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已被合并到GCG软件包中GAP程序中,其使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,16、14、12、10、8、6或4的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。在另一优选的实施方案中,使用GCG软件包中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70、或80的缺口权重和1、2、3、4、5、或6的长度权重,测定两条核苷酸序列之间的同一性百分比。特别优选的参数集(和除非另有说明应该使用的)为Blossum 62评分矩阵,缺口罚分12、缺口延长罚分4和移码缺口罚分5。

[0130] 可以使用E.Meyers和W.Miller(Cabios.4:11-17,1989)的算法测定两条氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比,所述算法被并入ALIGN程序(2.0版),使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分12和缺口罚分4。

[0131] 本文所述的核酸和蛋白序列可以用作“查询序列”用于进行针对公共数据库的检索,例如,用于鉴定其他家族成员或有关的序列。可以使用Altschul,et al.,(1990、J.Mol.Biol,215:403-10)的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行此类检索。可以用NBLAST程序、评分=100、字长=12进行BLAST核苷酸检索,从而获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序、评分=50、字长=3进行BLAST蛋白检索,从而获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的缺口比对,可以利用Altschul,et al.,(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)中所述的缺口BLAST。当利用BLAST和缺口BLAST程序时,可以使用各自程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0132] 在一实施方案中,如上文所示,可以使用BLAST比对工具评估多核苷酸和/或多肽。局部比对简单地由一对序列节段组成,来自每一被比较的序列的一个。Smith-Waterman或Sellers算法的修改可以找到延长或修剪不能提高评分的所有节段对,称为高评分节段对(HSPs)。BLAST比对的结果包括统计学标准,从而指示BLAST评分可以偶然得出的可能性。

[0133] 从与每一比对的序列有关的缺口和取代数目计算初始值S,其中较高相似性评分

指示更为显著的比对。通过查阅表(见PAM,BLOSUM)给出取代评分。

[0134] 缺口评分通常计算为缺口开放罚分G和缺口延长罚分L之和。对长度n的缺口而言,缺口成本为G+Ln。缺口成本、G和L的选择是根据经验的,但是通常为G选择高值(10-15),例如11,为L选择低值(1-2),例如1。

[0135] 二进制评分S' 衍生于初始比对评分S,其中考虑所用的评分系统的统计学性质。二进制评分被相对于评分系统标准化,因此它们可以用于比较来自不同检索的比对评分。术语“二进制评分”和“相似性评分”可互换地使用。二进制评分给出了比对的好坏程度的指示;评分越高,比对越好。

[0136] E值或期望值描述了相似评分的序列偶然出现在数据库中的可能性。预测评分等同于或优于S的、预期在数据库检索中偶然出现的不同比对的数目。E值越小,比对越显著。例如,具有 e^{-117} 的E值的比对表示相似评分的序列非常不可能只是偶然出现。此外,用于比对随机的氨基酸对的期待评分被要求是负的,否则长的比对将倾向于具有高评分,无论比对的节段是否相关。并且,BLAST算法使用适当的期待矩阵,核苷酸或氨基酸和用于缺口的比对使用缺口创建和延长罚分。例如,通常使用BLOSUM62矩阵,缺口存在罚分11和缺口延长罚分1进行多肽序列的BLAST比对和比较。

[0137] 在一实施方案中,报道了使用BLOSUM62矩阵、缺口存在罚分11和缺口延长罚分1,来自BLAST分析的序列相似性评分。

[0138] 在一具体的实施方案中,本文提供的序列同一性/相似性评分指的是使用GAP第10版(GCG,Accelrys,San Diego,Calif.)使用下列的参数所获得的值:核苷酸序列的同一性%和相似性%,使用GAP权重50、长度权重3和nwsgapdna.cmp评分矩阵;氨基酸序列的同一性%和相似性%,使用GAP权重8、长度权重2和BLOSUM62评分矩阵(Henikoff和Henikoff,PNAS USA.89:10915-10919,1992)。GAP使用Needleman和Wunsch算法(J Mol Biol.48:443-453,1970)用以找到使匹配的数目最大而缺口数目最小的两条完整的序列的比对。

[0139] 在一具体的实施方案中,变体多肽包含可最佳地与参照多肽序列(例如见序列列表)比对的氨基酸序列,从而产生BLAST二进制评分或序列相似性评分至少约50、60、70、80、90、100、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000或更高,包括上述数值之间的所有整数和范围,其中BLAST比对使用BLOSUM62矩阵,缺口存在罚分11和缺口延长罚分1。

[0140] 如上文所示,可以以不同的方式改变参照多肽,包括氨基酸取代、缺失、截短、添加和插入。此类操作的方法通常为本领域中已知的。例如,可以通过DNA突变制备参照多肽的氨基酸序列变体。用于诱变和核苷酸序列改变的方法为本领域中熟知的。例如见Kunkel(PNAS USA.82:488-492,1985);Kunkel et al.,(Methods in Enzymol.154:367-382,1987)、美国专利4,873,192号、Watson,J.D.et al.,(“基因分子生物学,”第4版,Benjamin/Cummings,Menlo Park,Calif.,1987)和本文所引用的参考文献。作为不影响感兴趣的蛋白的生物学活性的合适的氨基酸取代的指导可在Dayhoff et al.,(1978),蛋白序列和结构

的图谱 (Nat'l. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) 中找到。

[0141] 用于筛选通过此类修饰所产生的组合文库的基因产物的方法和用于筛选用于具有所选特性的基因产物的cDNA文库的方法为本领域中已知的。此类方法可适应通过参照多肽的组合突变所产生的基因文库的快速筛选。举例来说, 递归整体突变 (REM) 是增强文库中功能突变体的频率的技术, 其可以与筛选测定组合使用从而鉴定多肽变体 (Arkin 和 Yourvan, PNAS USA 89:7811-7815, 1992; Delgrave et al., 蛋白改造. 6:327-331, 1993)。

[0142] 示例性缀合方法。使用标准的化学、生物化学和/或分子学技术可以进行p97多肽序列与溶酶体贮积症 (LSD) 蛋白或其他感兴趣的试剂的缀合或结合。事实上, 按照本发明的公开内容、使用可获得的领域公认的方法制造p97缀合的方法是很清楚的。当然, 通常优选的是当结合本发明的p97缀合物的主要组分时, 所用的技术和由此得到的化学连接基本上不会扰乱缀合物的个体组分的所希望的功能或活性。

[0143] 所用的具体结合化学方法取决于生物活性剂 (例如小分子, 多肽) 的结构, 生物活性剂中多官能团的潜在存在, 是否需要保护/去保护步骤, 试剂的化学稳定性等, 并且可由本领域中技术人员容易地确定。例如, 用于制备本发明的p97缀合物的示例性结合化学方法可见于Wong (1991), “蛋白缀合和交联化学”, CRC Press, Boca Raton, Fla.; 和Brinkley“用染料、半抗原和交联试剂制备蛋白缀合物的方法的简短调查”Bioconjug. Chem., 3:2013, 1992。优选地, 缀合物的结合能力和/或活性基本上不会由于所用的缀合技术而减少, 例如, 相对于未缀合的LSD多肽或试剂或未缀合的p97多肽。

[0144] 在某些实施方案中, p97多肽序列可与LSD多肽或其他感兴趣的试剂直接地或间接地结合。当p97多肽序列和LSD多肽或其他感兴趣的试剂中每一个都拥有能够与另一者发生反应的取代基时, p97多肽序列和LSD多肽或其他感兴趣的试剂之间直接反应是可能的。例如, 一者上的亲核基团 (诸如氨基或巯基) 能够与另一者上的含有羰基的基团 (诸如酸酐或酰基卤) 或含有良好脱离基团 (例如卤化物) 的烷基发生反应。

[0145] 可选地, 经由连接子 (包括非肽连接子和肽连接子) 间接地结合p97多肽序列和LSD多肽或其他感兴趣的试剂是可取的。连接子也可起间隔物的作用, 用以将感兴趣的试剂与p97多肽序列离开, 以避免干扰结合能力、靶向能力或其他功能。连接子也可用于增加试剂上取代基的化学反应性, 并因此增加结合效率。化学反应性的增加也可促进试剂或试剂上的官能团的利用, 在其他情况是不可能的。也可用可释放的或稳定的连接子的选择来改变p97缀合物和连接的抗体或其他感兴趣的试剂的药代动力学。示例性的连接子基团包括, 例如, 二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。在另一示例性实施方案中, 缀合物包括连接子基团, 诸如美国专利5,208,020号或欧洲专利0425235B1和Chariet al., 癌症研究. 52:127-131, 1992中公开的那些基团。下文描述了额外的示例性连接子。

[0146] 在一些实施方案中, 将多个p97多肽序列与LSD多肽或其他试剂结合是可取的, 或将p97多肽序列与多个LSD多肽或其他试剂结合也是可取的。例如, 在某些实施方案中, 多个p97多肽序列与一个LSD多肽或其他试剂结合, 或可选地一个或多个p97多肽与多个LSD多肽或其他试剂缀合。p97多肽序列可以是相同的或不同的。无论在任何具体实施方案中, 可以不同的方式制备包含多个p97多肽序列的缀合物。例如, 多个多肽可直接地结合试剂, 或可以使用提供用于连接的多个位点的连接子。可以用任一种已知异源双功能交联策略来

制备本发明的缀合物。应理解的是,通过控制缀合/交联程序期间所用材料的化学计量学可以获得多种这样的实施方案。

[0147] 在某些示例性实施方案中,包含琥珀酰亚胺酯官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成酰胺连接;包含氧羰基咪唑官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成氨基甲酸酯连接;包含对硝基苯基碳酸酯官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成氨基甲酸酯连接;包含三氯苯基碳酸酯官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成氨基甲酸酯连接;包含硫酯官能团的试剂与包含n-末端氨基的p97多肽之间的反应形成酰胺连接;包含丙醛官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接。

[0148] 在一些示例性实施方案中,包含丁醛官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含乙缩醛官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含哌啶酮官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含甲基酮官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含三氟乙基磺酸酯官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含马来酰亚胺官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;包含醛官能团的试剂与包含氨基的p97多肽之间的反应形成仲胺连接;以及包含胍官能团的试剂与包含氨基的P97多肽之间的反应形成仲胺连接。

[0149] 在具体示例性实施方案中,包含马来酰亚胺官能团的试剂与包含硫醇基的P97多肽之间的反应形成硫醚连接;包含乙烯砷官能团的试剂与包含硫醇基的P97多肽之间的反应形成硫醚连接;包含硫醇官能团的试剂与包含硫醇基的P97多肽之间的反应形成二硫连接;包含邻二硫吡啶官能团的试剂与包含硫醇基的P97多肽之间的反应形成二硫连接;以及包含碘乙酰胺官能团的试剂与包含硫醇基的P97多肽之间的反应形成硫醚连接。

[0150] 在具体的实施方案中,胺-巯基交联剂用于制备缀合物。在一优选的实施方案中,例如,交联剂为琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)(Thermo Scientific),其为在中长环己烷稳定的间隔臂(8.3埃)的相对端包含NHS-酯和马来酰亚胺反应基的巯基交联剂。SMCC为不可裂解的和膜可通透性交联剂,可以用于产生用于与p97多肽序列后续反应的巯基反应性、马来酰亚胺活化试剂(例如多肽,抗体)。在pH 7-9下,NHS酯与伯胺反应形成稳定的酰胺键。在pH6.5-7.5下,马来酰亚胺与巯基反应形成稳定的硫醚键。因此,SMCC的酰胺反应性NHS酯与试剂的伯胺快速交联,并且得到的巯基反应性马来酰亚胺基可以与p97的半胱氨酸残基反应,从而产生感兴趣的具体缀合物。

[0151] 在某些具体的实施方案中,修饰p97多肽序列,使其包含暴露的巯基以便促进交联,例如促进与马来酰亚胺活化试剂的交联。在一更具体的实施方案中,用试剂修饰p97多肽序列,所述试剂修饰伯胺来添加受保护的硫醇巯基。在一更具体的实施方案中,试剂N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)(Thermo Scientific)用于产生硫醇化p97多肽。

[0152] 在其他具体的实施方案中,在合适的条件下,马来酰亚胺活化试剂与硫醇化p97多肽反应从而产生本发明的缀合物。应理解的是,通过控制SMCC、SATA、试剂和p97多肽在这些反应中的比率,可能产生具有不同的化学计量学、分子量和特性的缀合物。

[0153] 在其他示例性的实施方案中,使用双功能蛋白连接剂来制备缀合物,诸如N-马来酰亚胺基-3-(2-吡啶联巯基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己

烷-1-羧酸酯、亚胺基硫烷(IT),亚胺酸酯的双功能衍生物(诸如二甲基己二亚酰胺化物HCL)、活化酯类(诸如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛(诸如戊二醛)、双偶氮化合物(诸如双(对偶氮基苯甲酰)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、以及双活性的氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。具体的连接剂包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson et al., Biochem.J.173:723-737[1978])和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶硫代)戊酸酯(SPP)从而提供二硫连接。

[0154] 本文公开的具体的交联策略仅是可用在产生本发明的缀合物的许多合适的缀合策略实例的少数。对本领域中技术人员显而易见的是,各种其他双功能的或多功能的试剂,包括同功能和异功能的(诸如Pierce Chemical Co.,Rockford,IL的目录表中所述的那些),可作为连接子使用。例如,通过氨基、羧基、巯基或氧化糖残基可实现缀合。有许多参考文献描述了此类方法,例如美国专利4,671,958号,Rodwell等。

[0155] 具体的实施方案可用一个或多个醛标签,从而促进p97多肽与LSD多肽或其他试剂之间的缀合(见美国专利8,097,701号和7,985,783号,在此通过引用并入本文)。此处,通过甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的作用在醛标签的硫酸酯酶基序处进行的酶修饰产生了甲酰甘氨酸(FGly)残基。FGly残基的醛部分可以利用为感兴趣的部分位点特异性连接到多肽的化学把手。在一些方面,感兴趣的部分为小分子、类肽、适配子或肽模拟物。在一些方面,感兴趣的部分为另一多肽,诸如抗体。

[0156] 因此,具体的实施方案包括含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个异源硫酸酯酶基序的p97多肽或LSD多肽或其他多肽试剂,其中所述基序包含下列结构:

[0157] $X_1Z_1X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO:4)

[0158] 其中 Z_1 为半胱氨酸或丝氨酸; Z_2 为脯氨酸或丙氨酸残基; X_1 存在或不存在,并且当存在时,为任何氨基酸,其中当异源硫酸酯酶基序处于醛标记的多肽的N末端时, X_1 为优选存在; X_2 和 X_3 每一个独立地为任何氨基酸。

[0159] 通过FGE酶可以修饰具有上述基序的多肽从而产生具有FGly残基的基序,如上文所示的,其可以用于例如经由连接子部分的试剂(诸如第二多肽)的位点特异性连接。例如,通过在表达FGE酶的哺乳动物、酵母或细菌细胞中表达包含硫酸酯酶基序的多肽(例如p97、LSD多肽)或通过具有分离的FGE酶的分离的多肽的体外修饰(见Wu et al.,PNAS.106:3000-3005,2009;Rush和Bertozzi,J.Am Chem Soc.130:12240-1,2008;和Carlson et al.,J Biol Chem.283:20117-25,2008)可以进行此类修饰。

[0160] 因此,一些实施方案包括含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个具有甲酰甘氨酸残基的异源硫酸酯酶基序的p97多肽或多肽试剂(例如LSD多肽),其中所述基序包含下列结构:

[0161] $X_1(FGly)X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO:5)

[0162] 其中FGly为甲酰甘氨酸残基; Z_2 为脯氨酸或丙氨酸残基; X_1 存在或不存在,并且当存在时,为任何氨基酸,其中当异源硫酸酯酶基序处于醛标记的多肽的N末端时, X_1 优选存在; X_2 和 X_3 每一个独立地为任何氨基酸。

[0163] 在具体的实施方案中, X_1 、 X_2 和 X_3 每一个独立地为脂肪族氨基酸、含硫氨基酸或极性、不带电荷氨基酸。例如, X_1 可以为L、M、V、S或T; X_2 和/或 X_3 可以独立地为S、T、A、V、G或C。

[0164] 在一些实施方案中,异源硫酸酯酶基序可以(a)长度小于16个氨基酸残基,包括约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个残基长度,(b)位于多肽的N末端,(c)位于多肽的C末端,(d)位于多肽天然的氨基酸序列的内部位点,(e)位于多肽的末端环,(f)位于多肽的翻译后修饰位点(例如糖基化位点),或以上任何组合。

[0165] 一些实施方案涉及(i)包含硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽和(ii)诸如被醛反应基官能化的分子的试剂(A)的缀合物,其中(i)和(ii)经由硫酸酯酶基序的FGly残基和醛反应基共价连接。此类缀合物可以具有下列通用结构的其中之一:

[0166] $p97(FGly)-R_1-A$

[0167] 其中 R_1 为至少一个醛反应连接;并且FGly为异源硫酸酯酶基序中的甲酰甘氨酸残基。

[0168] 一些实施方案涉及(i)包含硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽和(ii)被醛反应基官能化的多肽试剂(pA)的缀合物,或反过来的缀合物,其中(i)和(ii)经由硫酸酯酶基序的FGly残基和醛反应基共价地连接。此类缀合物可以具有下列通用结构的其中之一:

[0169] $p97(FGly)-R_1-pA$ 或 $p97-R_1-(FGly)pA$

[0170] 其中 R_1 为至少一个醛反应连接;并且FGly为异源硫酸酯酶基序中的甲酰甘氨酸残基。

[0171] 可以用一个或多个醛反应基(诸如氨基氧、酰肼和氨基硫脲)使试剂或包含非醛标签的多肽(例如p97多肽,LSD多肽)官能化,然后经由至少一个FGly残基共价地与包含醛标签的多肽连接,从而形成醛反应连接。氨基氧官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)的连接产生了FGly残基和官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)之间的肟连接;酰肼官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)的连接产生了FGly残基和官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)之间的肼连接;氨基硫脲官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)的连接产生了FGly残基和官能化的试剂(或包含非醛标签的多肽)之间的肼硫代苯甲酰胺连接。因此,在这些和有关的实施方案中, R_1 可以为包含Schiff碱的连接子,诸如肟连接、肼连接或肼硫代苯甲酰胺键。

[0172] 某些实施方案包括(i)包含硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽和(ii)包含硫酸酯酶基序(或醛标签)的LSD多肽试剂(A)的缀合物,其中(i)和(ii)经由它们各自的FGly残基,任选地经由双官能化的连接子部分或基团共价地连接。例如,某些p97缀合物可包含下列结构:

[0173] $p97(FGly)-R_1-L-R_2-(FGly)A$

[0174] 其中 R_1 和 R_2 为相同的或不同的醛反应连接; L 为连接子部分,p97(FGly)为包含醛标签的p97多肽,(FGly)A为包含醛标签的试剂,诸如LSD多肽试剂。

[0175] 仅作为举例说明,在一些实施方案中,至少一个异源硫酸酯酶基序可以在p97多肽的C末端和基于多肽的试剂(例如LSD多肽)的N末端。在其他的实施方案中,至少一个异源硫酸酯酶基序可以在p97多肽的N末端和基于多肽的试剂的C末端。在其他的实施方案中,至少一个异源硫酸酯酶基序可以在p97多肽的N末端和基于多肽的试剂的N末端。在进一步的实施方案中,至少一个异源的硫酸酯酶基序可以在p97多肽的C末端和基于多肽的试剂的C末端。如上文所示,至少一个异源基序可以在p97多肽和/或基于多肽的试剂的内部位置。本领域中技术人员应意识到其他组合是可能的。

[0176] 通过任何醛反应基可以独立地形成 R_1 和 R_2 的醛反应连接,所述醛反应基在(i)醛标签的甲酰甘氨酸(FGly)残基和(ii)用所述醛反应基官能化的连接子部分(例如带有可以是相同的或不同的两个醛反应基的双功能的连接子)之间形成共价键。醛反应基的实例包括氨基氧、酰肼和氨基硫脲基团,其会形成包含具有FGly残基的连接的Schiff碱,包括肟连接、肼连接和肼硫代苯甲酰胺连接。因此, R_1 和 R_2 可以独立地为包含Schiff碱的连接,诸如肟连接、肼连接和肼硫代苯甲酰胺连接。

[0177] 在一些实施方案中,包含醛标签的p97多肽和包含醛标签的LSD多肽或其他试剂经由多功能的连接子(例如双功能的连接子)连接(例如共价连接),后者可用相同的或不同的醛反应基官能化。在这些和有关的实施方案中,醛反应基允许连接子在p97多肽和LSD多肽或其他试剂之间经由它们各自的FGly残基形成共价桥。连接子部分包括可以被一个或多个醛反应基官能化、优选双官能化或多官能化的任何部分或化学物。具体实例包括肽、水溶性聚合物、可检测的实体、其他治疗化合物(例如,细胞毒性化合物)、生物素/链霉亲和素部分、和聚糖(见Hudak et al., J Am Chem Soc.133:16127-35,2011)。聚糖(或糖苷)的具体实例包括氨基氧聚糖,诸如由糖基N-戊烯酸酰肼羧酸中间体(同上)组成的高阶聚糖。本文描述了示例性连接子,并且连接子可以根据本领域中常规技术用醛反应基官能化(例如见Carrico et al., Nat Chem Biol.3:321-322,2007;和美国专利8,097,701号和7,985,783号)。

[0178] 也可以通过多种“链接化学”技术制备p97缀合物,包括模块化的、宽范围的,产生非常高产率的,主要产生可以通过非色谱法移除的无害副产品,并且可以为立体定向的但未必对映选择性的反应(见Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl.40:2004-2021,2001)。具体实例包括用叠氮化物和炔烃的Huisgen1,3-双极环加成作用,也称为“叠氮化物-炔烃的环加成作用”反应的缀合技术(见Hein et al., Pharm Res.25:2216-2230,2008)。叠氮化物-炔烃的环加成作用反应的非限制实例包括铜催化的叠氮化物-炔烃的环加成作用(CuAAC)反应和钌催化的叠氮化物-炔烃的环加成作用(RuAAC)反应。

[0179] CuAAC在宽的温度范围内工作,对水性条件不敏感,pH范围为4-12,并且接受广泛的官能团(见Himo et al., J Am Chem Soc.127:210-216,2005)。例如,可以使用抗坏血酸钠作为还原剂从Cu(I)盐或Cu(II)盐产生活化的Cu(I)催化剂。这一反应形成了1,4-取代的产物,使其成为区域特异的(见Hein et al.,同上)。

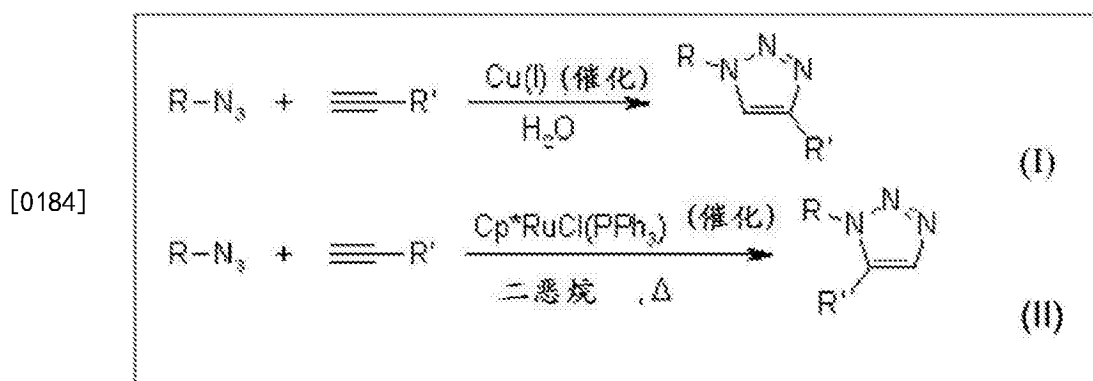
[0180] RuAAC利用五甲基环戊二烯基氯化钌[Cp*RuCl]复合物,所述复合物能够催化叠氮化物到末端炔烃的环加成作用,区域选择性导向1,5-双取代的1,2,3-三唑(见Rasmussen et al., Org. Lett.9:5337-5339,2007)。而且,与CuAAC相比之下,RuAAC也可以与内部的炔烃一起使用从而提供完全取代的1,2,3-三唑。

[0181] 因此,某些实施方案包括含至少一个带有叠氮化物侧链或炔烃侧链的非天然氨基酸的p97多肽,所述非天然氨基酸包括内部的和末端(例如N末端,C末端)的非天然氨基酸。通过包含叠氮化物侧链或炔烃侧链的非天然氨基酸的体内或体外(例如无细胞系统)合并可以形成这样的p97多肽中的某些。示例性体内技术包括细胞培养技术,例如,使用修饰的大肠杆菌(E.coli)(见Travis和Schultz, The Journal of Biological Chemistry.285:11039-44,2010;和Deiters与Schultz, Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters.15:1521-1524,2005),示例性体外技术包括无细胞系统(见Bundy, Bioconjug Chem.21:255-

63,2010)。

[0182] 在一些实施方案中,通过叠氮化物-炔烃环加成作用,将包含至少一个带有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的p97多肽缀合于包含至少一个炔烃基团的试剂(或连接子),诸如包含至少一个带有炔烃侧链的非天然氨基酸抗体或其他多肽试剂。在其他实施方案中,通过叠氮化物-炔烃环加成作用,将包含至少一个带有炔烃侧链的非天然氨基酸的p97多肽缀合于包含至少一个叠氮化物基团的抗体或其他多肽试剂(或连接子),诸如包含至少一个带有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的多肽试剂。因此,某些实施方案包括包含经由1,2,3-三唑连接子共价地连接的p97多肽与试剂的缀合物。

[0183] 通过下列的基于CuAAC或基于RuAAC的反应可以形成具体的p97缀合物,而分别包含下列的结构(I)或(II)。



[0185] 其中R为p97多肽,并且R¹为感兴趣的试剂(或连接子);或其中R为感兴趣的试剂(或连接子)并且R¹为p97多肽。

[0186] 在某些实施方案中,带有叠氮化物侧链的非天然氨基酸和/或带有炔烃侧链的非天然氨基酸为末端氨基酸(N末端,C末端)。在某些实施方案中,非天然氨基酸中的一个或多个位于内部。

[0187] 例如,某些实施方案包括包含带有叠氮化物侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含炔烃基的试剂缀合。一些实施方案包括包含带有叠氮化物侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含炔烃基的试剂缀合。具体实施方案包括包含带有炔烃侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含叠氮化物侧链的试剂缀合。实施方案还包括包含带有炔烃侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含叠氮化物侧基的试剂缀合。一些实施方案包括包含至少一个带有叠氮化物侧链的内部非天然氨基酸的p97多肽与包含炔烃基的试剂缀合。其他实施方案包括包含至少一个带有炔烃侧链的内部非天然氨基酸的p97多肽与包含叠氮化物侧基的试剂缀合。

[0188] 具体的实施方案包括包含带有叠氮化物侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有炔烃侧链的N末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。其他实施方案包括包含带有叠氮化物侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有炔烃侧链的C末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。其他实施方案还包括包含带有叠氮化物侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有炔烃侧链的C末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。实施方案还包括包含带有叠氮化物侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有炔烃侧链的N末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。

[0189] 其他实施方案包括包含带有炔烃侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带

有叠氮化物侧链的N末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。实施方案仍然还包括包含带有炔烃侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有叠氮化物侧链的C末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。额外的实施方案仍然还包括包含带有炔烃侧链的N末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有叠氮化物侧链的C末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。实施方案仍然还包括包含带有炔烃侧链的C末端非天然氨基酸的p97多肽与包含带有叠氮化物侧链的N末端非天然氨基酸的多肽试剂缀合。

[0190] 还包括产生p97缀合物的方法,其包括:(a)在(i)包含至少一个带有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的p97多肽和包含至少一个炔烃基(例如带有炔烃侧链的非天然氨基酸)的试剂之间;或在(ii)包含至少一个带有炔烃侧链的非天然氨基酸的p97多肽和包含至少一个叠氮化物基(例如带有叠氮化物侧链的非天然氨基酸)的试剂之间进行叠氮化物-炔烃环加成作用反应;和(b)从反应中分离p97缀合物,因此产生p97缀合物。

[0191] 在p97缀合物为融合多肽的情况下,通常可以使用标准技术制备融合多肽。然而,优选地,如本文所述的和领域中已知的,融合多肽在表达系统中表达为重组多肽。本发明的融合多肽可以包含一个或多个拷贝的p97多肽序列并且可包含一个或多个拷贝的基于多肽的感兴趣的试剂(例如LSD多肽),以任何所希望的安排存在。

[0192] 对融合蛋白而言,编码p97多肽、多肽试剂(例如LSD多肽)和任选的肽连接子组分的DNA序列可分别地组装,然后连接到适当的表达载体上。编码一个多肽组分的DNA序列的3'端,在利用或不利用肽连接子的情况下,被连接到编码其他多肽组分的DNA序列的5'端从而使得序列的阅读框是同相的。将连接好的DNA序列可操作地连接于合适的转录或翻译调节元件。负责DNA表达的调节元件仅位于编码第一多肽的DNA序列的5'端。同样,终止翻译所需的终止密码子和转录终止信号只存在于编码最C末端多肽的DNA序列的3'方向。这允许翻译为保持两种组分多肽的生物学活性的单个融合多肽。

[0193] 相似的技术,主要是设置调节元件(诸如启动子、终止密码子和转录终止信号),可以用于非融合蛋白的重组产生,例如p97多肽和多肽试剂(例如抗体试剂)用于产生非融合缀合物。

[0194] 本发明的多核苷酸和融合多核苷酸可以包含一个或多个拷贝的编码p97多肽序列的核酸,和/或可包含一个或多个拷贝的编码多肽试剂(诸如LSD多肽)的核酸。

[0195] 在一些实施方案中,将编码本发明p97多肽、抗体或其他多肽试剂和/或p97-多肽融合体的核酸直接地引入宿主细胞,并且在足以诱导所编码的多肽表达的条件下孵育细胞。可使用本领域中技术人员熟知的标准技术并结合本文所提供的多肽和核酸序列,制备本申请的多肽序列。

[0196] 因此,根据某些有关的实施方案,提供了包含编码本文所述的多肽的多核苷酸或融合多核苷酸的重组宿主细胞。通过在适当的条件下培养包含多核苷酸的重组宿主细胞,可便利地实现p97多肽、LSD多肽或p97-LSD多肽融合体在宿主细胞中的表达。通过表达产生后,可使用任何合适的技术分离和/或纯化多肽,然后按照希望使用。

[0197] 用于在各种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统为熟知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域中可获得的用于异源多肽表达的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、HEK-293细胞、NS0小鼠黑色素瘤细胞和许多其他的细胞。通常优选的细菌宿主为大肠杆菌(E.coli)。在本领域

中已完善地建立了在诸如大肠杆菌的原核细胞中表达多肽。例如综述可见Pluckthun, A.Bio/Technology.9:545-551 (1991)。培养物中真核细胞中的表达对本领域中技术人员也是可获得的作为用于多肽的重组产生的一个选择(见Ref,Curr.Opinion Biotech.4:573-576,1993;和Trill et al.,Curr.Opinion Biotech.6:553-560,1995)。

[0198] 可以选择或构建包含适当的调控序列的合适的载体,调控序列包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他适合的序列。视情况而定,载体可为质粒、病毒,例如噬菌体或噬菌粒。更多的细节,例如见分子克隆:实验室手册:第2版,Sambrook et al.,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press。许多已知的用于核酸操作的技术和方案,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、DNA引入细胞和基因表达以及蛋白分析,详细地描述在分子生物学实验指南,第2版,Ausubel et al.,eds.,John Wiley&Sons,1992,或其后续的更新版中。

[0199] 术语“宿主细胞”用于指已被引入或能够被引入编码一个或多个本文所述的多肽的核酸序列,并且表达或能够表达感兴趣的选定基因(诸如编码任何本文所述的多肽的基因)的细胞。该术语包括亲代细胞的后代,无论后代在形态学或基因组成上与初始亲代是否相同,只要存在选定基因即可。可以针对某些特征选择宿主细胞,所述特征例如是甲酰甘氨酸产生酶(FGE)的表达,用于使硫酸酯酶基序中的半胱氨酸或丝氨酸残基转换为甲酰甘氨酸(FGly)残基,或氨酰tRNA合成酶的表达,其可以使非天然氨基酸合并到多肽,包括带有叠氮化物侧链、炔基侧链或其他所希望的侧链的非天然氨基酸,从而促进缀合。

[0200] 因此,还考虑到了包括将此类核酸引入到宿主细胞的方法。核酸的引入可用任何可获得的技术。对真核细胞而言,合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒的转导,例如牛痘病毒或用于昆虫细胞的杆状病毒。对细菌细胞而言,合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。引入之后,可以引起或允许核酸表达,例如,通过在用于基因表达的条件下培养宿主细胞。在一实施方案中,核酸被整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准的技术,包含促进与基因组重组的序列可促进整合。

[0201] 在某些实施方案中,本发明还提供了下述方法,其包括在表达系统中使用本文所述的核酸构建体以表达具体的多肽,诸如如本文所述的p97多肽、LSD多肽或p97-LSD多肽融合蛋白。

[0202] 如上文所示,某些p97缀合物(诸如融合蛋白)可用一个或多个连接子基团,包括非肽连接子(例如非蛋白连接子)和肽连接子。此类连接子可以为稳定的连接子或可释放的连接子。

[0203] 示例性非肽稳定连接包括琥珀酰亚胺、丙酸、羧甲基连接、醚、氨基甲酸酯、酰胺、胺、脲、酰亚胺、脂族C-C键、硫醚键、硫代氨基甲酸酯、硫脲等。通常,对水解稳定的连接是在生理条件下表现出小于约1-2%至5%/天的水解率。

[0204] 示例性非肽可释放的连接包括羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧烷基酯、亚胺、原酸酯、硫代酯、硫醇酯、碳酸酯和脲连接。水解不稳定的或弱的连接的其他示例性的实施方案包括但不限于: $-O_2C-(CH_2)_b-O-$,其中b为1-5、 $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-$,其中b为1-5,并且c为2-5、 $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-O-$,其中b为1-5,并且c为2-5、 $-(CH_2)_b-OP(=O)(OR')_2-(CH_2)_{b'}-$,其中b为1-5,并且b'为1-5、 $-C(O)-(NH-CHR-CO)_a-NH-CHR-$,其中a为2-20,并且R为 α -氨基酸上存

在的取代基、 $-O-(CH_2)_b-CO_2-CHCH_2-CH_2-$ ，其中b为1-5、 $-O-C_6H_4-CH-N-(CH_2)_b-O-$ ，其中b为1-5、以及 $-O-(CH_2)_b-CH_2-CH-N-(CH_2)_b-O-$ ，其中每一b独立地为1-5。

[0205] 可释放的连接子的其他示例性的实例可为基于苄基消除的连接子、基于三烷基锁的连接子(或基于三烷基锁内酯化)、基于N二羟乙基甘氨酸连接子和酸不稳定的连接子。在酸不稳定的连接子中，可以为二硫键、含脲连接子和含硫代丙酸酯连接子。

[0206] 还包括细胞内化期间或细胞内化后可释放的或可切割的连接子。试剂从这些连接子基团进行细胞内释放的机制包括通过二硫键还原的切割(例如美国专利4,489,710号, Spittler)、通过对光不稳定键的辐照(例如美国专利4,625,014号, Senter等)、通过衍生的氨基酸侧链的水解(例如美国专利4,638,045号, Kohn等)、通过血清补体介导的水解(例如美国专利4,671,958号, Rodwell等)和酸催化的水解(例如美国专利4,569,789号, Blattler等)。在一实施方案中,可使用酸不稳定连接子(癌症研究52:127-131, 1992;和美国专利5,208,020号)。

[0207] 在某些实施方案中,在连接子中使用“水溶性聚合物”用于连接p97多肽序列与感兴趣的试剂。“水溶性聚合物”指的是在水中可溶的,通常基本上无免疫原性,并且通常具有大于约1,000道尔顿的原子分子量的聚合物。两个多肽经由水溶性聚合物的连接可以是所希望的,因为此类修饰可以通过增加血清半衰期而增加治疗指数,例如通过增加蛋白水解稳定性和/或降低肾清除率。额外地,经由一个或多个聚合物的连接可以减少蛋白药物的免疫原性。水溶性聚合物的具体实例包括聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物等。

[0208] 在一些实施方案中,水溶性聚合物具有大于约10,000Da、大于约20,000-500,000Da、大于约40,000Da-300,000Da、大于约50,000Da-70,000Da,通常大于约60,000Da的有效水动力学分子量。“有效水动力学分子量”指的是通过基于水的尺寸排阻色谱法(SEC)所测定的聚合物链的有效水溶大小。当水溶性聚合物包含具有聚烯氧化物重复单元(诸如氧化乙烯重复单元)的聚合物链时,每一链可以具有约200Da-约80,000Da,或约1,500Da-约42,000Da、特别感兴趣为2,000-约20,000Da的原子分子量。还包括直链的、分支的和末端带电荷的水溶性聚合物。

[0209] 用作醛标记的多肽之间的连接子的聚合物可以具有大范围的分子量和聚合物亚基。这些亚基可包括生物聚合物,合成的聚合物,或其组合。此类水溶性聚合物的实例包括:葡聚糖和葡聚糖衍生物,其包括硫酸葡聚糖,P-氨基交联糊精和羧甲基糊精,纤维素和纤维素衍生物,包括甲基纤维素和羧甲基纤维素,淀粉和糊精,以及淀粉的衍生物和羟化物,聚乙二醇和其衍生物,其包括聚乙二醇(PEG),甲氧聚乙二醇,聚乙二醇同聚物,聚丙二醇同聚物,乙二醇与丙二醇的共聚物,其中所述同聚物和共聚物为未取代的或其末端被烷基取代,肝素和肝素片段,聚乙烯醇和聚乙烯乙醚,聚乙烯吡咯烷酮,天冬酰胺,和聚氧乙烯化多元醇,葡聚糖和葡聚糖衍生物,糊精和糊精衍生物。应理解的是,还包括具体所述的水溶性聚合物的各种衍生物。

[0210] 水溶性聚合物为本领域中已知的,特别是基于聚烯氧化物的聚合物,诸如聚乙二醇“PEG”(见聚(乙二醇)化学:生物技术和生物医学用, J.M.Harris, Ed., Plenum Press, New York, N.Y. (1992); 和聚(乙二醇)化学和生物学用, J.M.Harris and S.Zalipsky, Eds., ACS (1997); 和国际专利申请:WO 90/13540、WO 92/00748、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/

14758、WO 94/17039、WO 94/18247、WO 94/28937、WO95/11924、WO 96/00080、WO 96/23794、WO 98/07713、WO 98/41562、WO 98/48837、WO 99/30727、WO 99/32134、WO 99/33483、WO99/53951、WO 01/26692、WO 95/13312、WO 96/21469、WO 97/03106、WO 99/45964、和美国专利4,179,337;5,075,046;5,089,261;5,100,992;5,134,192;5,166,309;5,171,264;5,213,891;5,219,564;5,275,838;5,281,698;5,298,643;5,312,808;5,321,095;5,324,844;5,349,001;5,352,756;5,405,877;5,455,027;5,446,090;5,470,829;5,478,805;5,567,422;5,605,976;5,612,460;5,614,549;5,618,528;5,672,662;5,637,749;5,643,575;5,650,388;5,681,567;5,686,110;5,730,990;5,739,208;5,756,593;5,808,096;5,824,778;5,824,784;5,840,900;5,874,500;5,880,131;5,900,461;5,902,588;5,919,442;5,919,455;5,932,462;5,965,119;5,965,566;5,985,263;5,990,237;6,011,042;6,013,283;6,077,939;6,113,906;6,127,355;6,177,087;6,180,095;6,194,580;6,214,966号,通过引用将以上文献并入本文)。

[0211] 示例性感兴趣的聚合物包括包含聚烯氧化物、聚酰胺烯氧化物或其衍生物(包括包含通式--(CH₂--CH²--O)--的环氧乙烷重复单元的聚烯氧化物和聚酰胺烯氧化物)的那些聚合物。另外的示例性感兴趣的聚合物包括具有分子量大于约1,000道尔顿,具有通式--[C(O)--X--C(O)--NH--Y--NH]_n--或--[NH--Y--NH--C(O)--X--C(O)]_n--的聚酰胺,其中X和Y二价的自由基,可以为相同的或不同的,并且可以为分支的或直链的,n为2-100,通常2-50的离散整数,其中X和Y中的一个或两者包含生物相容性、基本上无抗原性的水溶性重复单元,其可以为直链的或分支的。

[0212] 另外示例性水溶性重复单元包含具有通式--(CH₂--CH₂--O)--或--(CH₂--CH₂--O)--的氧化乙烯。此类水溶性重复单元的数目可以变化很大,此类单元通常数目在2-500、2-400、2-300、2-200、2-100个,并且最通常2-50个。示例性实施方案为其中X和Y中的一个或两者选自:--((CH₂)_{n1}--(CH₂--CH₂--O)_{n2}--(CH₂)--或--((CH₂)_{n1}--(O--CH₂--CH₂)_{n2}--(CH₂)_{n1}--),其中n1为1-6、1-5、1-4并且最通常1-3、其中n2为2-50、2-25、2-15、2-10、2-8、并且最通常2-5。另一示例性实施方案为其中X为--(CH₂--CH₂)--、Y为--(CH₂--(CH₂--CH₂--O)₃--CH₂--CH₂--CH₂)--或--(CH₂--CH₂--CH₂--(O--CH₂--CH₂)₃--CH₂)--,还有其他的变化。

[0213] 在某些实施方案中,肽连接子序列可用于分隔或连接p97缀合物的组分。例如,对多肽-多肽缀合物而言,肽连接子可以将组分分隔为足以确保每一多肽折叠为它的二级和三级结构的距离。使用本文所述的和本领域中熟知的标准技术,可将此类肽连接子序列合并入缀合物(例如融合蛋白)。合适的肽连接子序列可基于以下因素进行选择:(1)它们呈现柔性延伸构象的能力;(2)它们不能呈现能与第一或第二多肽上的功能表位相互作用的二级结构;和(3)缺乏可与多肽功能表位发生反应的疏水或带电荷残基。通常可用作连接子的氨基酸序列包括Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; 美国专利4,935,233号和美国专利4,751,180号中所公开的那些。

[0214] 在某些示例性的实施方案中,肽连接子为约1-5个氨基酸,5-10个氨基酸,5-25个氨基酸,5-50个氨基酸,10-25个氨基酸,10-50个氨基酸,10-100个氨基酸,或任何介于中间范围的氨基酸。在其他示例性的实施方案中,肽连接子的长度包含约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸。具体的连接子可以具有约1-200个氨基酸、1-150个氨基

酸、1-100个氨基酸、1-90个氨基酸、1-80个氨基酸、1-70个氨基酸、1-60个氨基酸、1-50个氨基酸、1-40个氨基酸、1-30个氨基酸、1-20个氨基酸、1-10个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸、或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸的总氨基酸长度。

[0215] 肽连接子可用如本文其他部分所述的和本领域中已知的任意一种或多种天然存在的氨基酸,非天然存在的氨基酸,氨基酸类似物,和/或氨基酸模拟物。可用作连接子的某些氨基酸序列包括Maratea et al.,Gene 40:39-46,1985;Murphy et al.,PNAS USA.83:8258-8262,1986;美国专利4,935,233号和美国专利4,751,180号中所公开的那些。具体的肽连接子序列包含Gly、Ser和/或Asn残基。若需要,其他接近中性的氨基酸,诸如Thr和Ala也可用在肽连接子序列中。

[0216] 某些示例性连接子包括包含Gly、Ser和/或Asn的连接子、如下:[G]_x、[S]_x、[N]_x、[GS]_x、[GGS]_x、[GSS]_x、[GSGS]_x(SEQ ID NO:6)、[GGSG]_x(SEQ ID NO:7)、[GGGS]_x(SEQ ID NO:8)、[GGGGS]_x(SEQ ID NO:9)、[GN]_x、[GGN]_x、[GNN]_x、[GNGN]_x(SEQ ID NO:10)、[GGNG]_x(SEQ ID NO:11)、[GGGN]_x(SEQ ID NO:12)、[GGGGN]_x(SEQ ID NO:13)连接子,其中_x为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或更多。这些和有关的氨基酸的其他组合对本领域中技术人员是明显的。

[0217] 在具体的实施方案中,连接子序列包含Gly₃连接子序列,其包括3个甘氨酸残基。在具体的实施方案中,使用能够为DNA结合位点和肽它们自身建模的计算机程序(Desjarlais&Berg,PNAS.90:2256-2260,1993;和PNAS.91:11099-11103,1994)和通过噬菌体展示方法可以合理地设计柔性连接子。

[0218] 肽连接子可为生理学上稳定的或可包括可释放的连接子,诸如生理学上可降解的或酶学可降解的连接子(例如可蛋白酶裂解的连接子)。在某些实施方案中,一个或多个可释放的连接子可以导致缀合物更短的半衰期和更快速的清除。例如,这些和有关的实施方案可以用于增强p97缀合物在血流中的溶解度和血液循环寿命,同时继连接子降解之后,还能递送基本上没有p97序列的试剂到血流(或穿过BBB)。这些方面在以下情况下特别有用,其中多肽或其他试剂,当与p97序列永久地缀合时,会表现出降低的活性。通过使用本文所提供的连接子,此类抗体可以在处于缀合形式时维持它们的治疗活性。以这些和其他方式,p97缀合物的特性可以更有效地适应以平衡抗体随时间的生物活性和循环半衰期。

[0219] 适用于本发明的具体实施方案中的酶学可降解的连接子包括但不限于:被诸如凝血酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶或枯草杆菌蛋白酶的丝氨酸蛋白酶切割的氨基酸序列。凝血酶可切割的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于:-Gly-Arg-Gly-Asp-(SEQ ID NO:14)、-Gly-Gly-Arg-、-Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-(SEQ ID NO:15)、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-(SEQ ID NO:16)、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-(SEQ ID NO:17)、-Gly-Pro-Arg-、-Val-Pro-Arg-和-Phe-Val-Arg-。弹性蛋白酶可切割的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于:-Ala-Ala-Ala-、-Ala-Ala-Pro-Val-(SEQ ID NO:18)、-Ala-Ala-Pro-Leu-(SEQ ID NO:19)、-Ala-Ala-Pro-Phe-(SEQ ID NO:20)、-Ala-Ala-Pro-Ala-(SEQ ID NO:21)和-Ala-Tyr-Leu-Val-(SEQ ID NO:22)。

[0220] 适用于本发明的具体实施方案的酶学可降解的连接子还包括可以被诸如胶原酶、

基质溶素、明胶酶的基质金属蛋白酶所切割的氨基酸序列。基质金属蛋白酶可切割的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于：-Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:23)、-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:24)、-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:25) 和-Ala-Pro-Gly-Leu-Z- (SEQ ID NO:26)，其中Y和Z为氨基酸。胶原酶可切割的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于：-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z- (SEQ ID NO:27)、-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z- (SEQ ID NO:28)、-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp- (SEQ ID NO:29)、-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His- (SEQ ID NO:30)、-Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala- (SEQ ID NO:31)、-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:32) 和-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:33)，其中Z为氨基酸。基质溶素可切割的氨基酸序列的示例性实例为-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Tyr-Met-Arg- (SEQ ID NO:34)；明胶酶可切割的氨基酸序列的实例为-Pro-Leu-Gly-Met-Tyr-Ser-Arg- (SEQ ID NO:35)。

[0221] 适用于本发明的具体实施方案的酶学可降解的连接子还包括可以被血管紧张素转化酶所切割的氨基酸序列，例如，-Asp-Lys-Pro-、-Gly-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:36) 和-Gly-Ser-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:37)。

[0222] 适用于本发明的具体实施方案的酶学可降解的连接子还包括可以被组织蛋白酶B所降解的氨基酸序列，例如-Val-Cit-、-Ala-Leu-Ala-Leu- (SEQ ID NO:38)、-Gly-Phe-Leu-Gly- (SEQ ID NO:39) 和-Phe-Lys-。

[0223] 然而，在某些实施方案中，任意一个或多个非肽或肽连接子为任选的。例如，当第一和第二多肽具有可用于分隔功能结构域和防止空间干扰的非必需的N末端和/或C末端的氨基酸区域时，融合蛋白中不需要连接子序列。

[0224] 使用本领域中技术人员已知的各种方法，包括，例如亲和力/结合测定（例如，表面等离子体共振，竞争性抑制作用测定），可评估本文所述的p97多肽和p97多肽缀合物的功能特性。例如，测试本文所述的缀合物对受体内化、体外和体内功效等的影响，包括穿过血脑屏障的运输率。可以使用本领域中技术人员已知的完善建立的方案进行此类测定（例如分子生物学实验指南）（Greene Publ.Assoc.Inc.&John Wiley&Sons,Inc.,NY,NY）；免疫学实验指南（编辑：John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober 2001John Wiley&Sons,NY,NY）；或商购试剂盒。

[0225] 使用方法和药物组合物

[0226] 本发明的某些实施方案涉及使用本文所述的脱磷酸化的溶酶体贮积症 (LSD) 蛋白和有关的p97缀合物的组合物的方法。此类方法的实例包括治疗方法和诊断方法，例如包括，脱磷酸化的LSD蛋白或有关的p97缀合物用于某些器官/组织（诸如神经系统）的医学成像。一些实施方案包括诊断和/或治疗中枢神经系统 (CNS) 的病症或状态，或具有CNS组分的病症或状态的方法。具体的方面包括治疗溶酶体贮积症 (LSD) 的方法，包括具有CNS组分的溶酶体贮积症。

[0227] 因此，某些实施方案包括治疗有需要的个体的方法，包括给予包含本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或其p97缀合物的组合物。还包括将试剂递送到个体的神经系统（例如中枢神经系统组织）的方法，包括给予包含本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或其p97缀合物的组合物。在这些和有关的实施方案的一些中，例如，相对于通过包含相对地或正常地磷酸化的LSD蛋白或未缀合的LSD蛋白的组合物的递送，该方法增加了试剂到中枢

神经系统组织的递送率。

[0228] 在某些情况下,个体患有溶酶体贮积症或具有患溶酶体贮积症的风险。因此,某些方法涉及治疗有需要的个体的溶酶体贮积症,任选地为与中枢神经系统有关的溶酶体贮积症,或累及CNS的溶酶体贮积症。示例性溶酶体贮积症包括II型粘多糖贮积症(亨特氏综合征)、I型粘多糖贮积症(贺勒氏综合征)、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆甾醇酯贮积症、沃尔曼病、胱氨酸症、Danon病、法布瑞氏症、法伯脂肪肉芽肿病、法伯症、岩藻糖苷贮积症、I/II型半乳糖唾液酸贮积症、I/II/III型戈谢病、戈谢病、球形细胞脑白质病、克拉伯病、糖原贮积症II、蓬佩病、I/II/III型GM1-神经节苷脂贮积症、I型GM2-神经节苷脂贮积症、戴萨克斯症、II型GM2-神经节苷脂贮积症、山德霍夫氏病、GM2-神经节苷脂贮积症、I/II型 α -甘露糖贮积症、 β -甘露糖贮积症、异染性脑白质病、I型粘脂贮积症、I/II型唾液酸贮积症、II/III型粘脂贮积症、I型细胞病、IIIC型粘脂贮积症、假胡尔勒氏多种营养不良、IIIA型粘多糖贮积症、沙佩立波综合征、IIIB型粘多糖贮积症、IIIC型粘多糖贮积症、IIID型粘多糖贮积症、IVA型粘多糖贮积症、莫基奥综合征、IVB型粘多糖贮积症、VI型粘多糖贮积症、VII型粘多糖贮积症、Sly综合征、IX型粘多糖贮积症、多种硫酸酯酶缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症、CLN1贝敦氏症、NB型尼曼匹克病、尼曼匹克病、C1型尼曼匹克病、C2型尼曼匹克病、致密性成骨不全症、I/II型辛德勒病、辛德勒病和唾液酸贮积症。在这些和有关的实施方案中,如本文所述,基本上脱磷酸化的LSD蛋白可以单独地给药和/或作为p97缀合物给药。

[0229] 在具体的方面,溶酶体贮积症为II型粘多糖贮积症(MPSII;亨特氏综合征),并且LSD蛋白为基本上脱磷酸化的形式的人IDS。亨特氏综合征为X染色体连锁的多系统病症,特征为葡糖氨基葡聚糖(GAG)积聚。绝大部分的受累者为男性;在个别情况下携带者女性显示了调查结果。发病年龄、疾病严重度和进展速度可以差异明显。

[0230] 在患有严重疾病的那些患者中,累及CNS(主要地表现为进行性认知退化)、进行性气道疾病和心脏病通常在生命的第一个十年或第二个十年中导致死亡。因此某些实施方案包括治疗累及CNS的亨特氏综合征。

[0231] 在患有较轻疾病的那些患者中,CNS没有(或最低限度地)受到影响,虽然GAG积聚对其他器官系统的影响可以与患有进行性认知减退的那些患者一样严重。正常智力的成年人早期存活在较轻性疾病中是常见的。然而,患有较轻性疾病的个体仍然可以受益于脱磷酸化的LSD蛋白(例如IDS)的给药,其具有提高的向CNS组织的穿透能力,例如,从而降低较轻性亨特氏综合征进展到累及CNS的亨特氏综合征的风险。

[0232] 在这两种形式的亨特氏综合征中其他的表现包括:身材矮小,有或没有交通性脑积水的畸形巨头;巨舌;声音嘶哑;传导性和感觉神经性听力损失;肝肿大和/或脾肿大;多发性成骨异常和关节挛缩,包括颞颌关节的关节僵硬;椎管狭窄;和腕管综合征。因此,接受本文所述的LSD蛋白治疗的个体可以具有这些亨特氏综合征的表现中的一个或多个。

[0233] 尿GAG和骨骼检查可以确立MPS状态的存在,但对MPSII不是特异的。男性渊源者中诊断MPSII的金标准为在至少一个其他硫酸酯酶的正常活性存在的情况下,白细胞、成纤维细胞或血浆中艾杜糖醛酸硫酸酯酶(IDS)酶活性不足。IDS(唯一的已知其中突变与亨特氏综合征有关的基因)的分子基因检测可以用于确认诊断带有异常表型或与GAG检测的结果不匹配的表型的男性渊源者。

[0234] 亨特氏综合征的常规治疗包括发育疗法、职业疗法和物理疗法;脑积水分流;扁桃

腺切除术和腺样体切除术;正压通气(CPAP或气管造口术);腕管松解术;心脏瓣膜置换术;腹股沟疝修补术。因此,在某些方面,通过本文所述的LSD蛋白治疗的个体可以即将经历、正在经历或已经历这些治疗中的一种或多种。

[0235] 疾病监测可以取决于累及的器官系统和疾病严重度,并且通常包括年度的心脏评估和超声波心动图;包括肺功能检查的肺评估;听力敏度图;视力检查;发展性评价;和神经检查。额外的研究可包括阻塞性呼吸暂停的睡眠研究;用以评估腕管综合征的神经传导速度(NCV);脑积水评估;用以监测髋关节疾病的整形外科评估;因此,在一些方面,通过本文所述的LSD蛋白治疗的个体即将经受,正在经受,或已经受这些疾病监测方案中的一种或多种。

[0236] 在其他方面,LSD为I型粘多糖贮积症(贺勒氏综合征),并且LSD蛋白为基本上脱磷酸化的形式的人L-艾杜糖醛酸酶。I型粘多糖贮积症(MPS I)为进行性多系统病症,带有连续严重性范围的特征。虽然受累的个体被常规分类为患有三种MPS I综合征(即,贺勒氏综合征、贺勒氏-施艾氏综合征或施艾氏综合征)其中之一,但是没有鉴定出生化方面的差异并且临床表现相重叠;因此,受累的个体最经常描述为患有严重的或较轻的MPS I,作为影响治疗方式的差别。

[0237] 在严重的MPS I中,婴儿在出生时似乎正常,并且通常早期表现为非特异性的(例如脐带的或腹股沟疝,在1岁之前频繁的上呼吸道感染)。面部特征的粗化直到1岁后才变得明显。脊椎下部的吉布斯驼背畸形是常见的。涉及所有骨的进行性骨骼发育不良(多发性成骨异常)是普遍的。到3岁时,线性生长停止。智力障碍是进行性并且严重的。听力损失是常见的。通常在生命的第一个十年发生由心肺衰竭引起的死亡。在某些方面,接受本文所述的LSD蛋白治疗的个体可患有严重的MPS I,任选地累及CNS。

[0238] 在较轻的MPS I中,严重性和疾病发展的速度变化从严重的威胁生命的导致第二到第三个十年中死亡的并发症到正常寿命伴随显著的进行性关节障碍的临床表现。虽然一些个体没有累及神经并且在儿童早期精神运动发育是正常的,但是学习障碍可以是存在的。临床发病通常在3岁-10岁。听力损失和心脏瓣膜病是常见的。在某些方面,接受本文所述的LSD蛋白治疗的个体可患有较轻的MPS I,任选地累及CNS。

[0239] MPS I的诊断通常依赖外周血白细胞、培养的成纤维细胞或血浆中溶酶体酶 α -L-艾杜糖醛酸酶的活性不足的表现。增高的葡糖氨基葡聚糖(GAG)(例如乙酰肝素和硫酸皮肤素)的尿排泄也是有用的初步试验。IDUA(目前已知的唯一的其中突变引起MPS I的基因)的分子基因检测是临床上可行的。序列分析预期能鉴定大多数患有MPS I个体中IDUA突变。因此,接受本文所述的LSD蛋白治疗的个体可有这些MPS I特征中的一个或多个。

[0240] MPS I的常见表现的治疗包括婴儿学习程序/发育迟缓的特殊教育;带帽檐的帽子/太阳镜用以减少眩光;若需要进行心脏瓣膜置换;物理治疗,若需要进行骨科手术(关节置换,寰枕稳定,用于腕管综合征的正中神经减压);用于脑积水的脑脊液(CSF)分流;用于咽鼓管功能障碍和/或上呼吸道阻塞的扁桃腺切除术和腺样体切除术;用于睡眠呼吸暂停、肺动脉高血压、右心衰竭的气管造口术;PE管;和颈椎病的外科手术干预。因此,在某些方面,通过本文所述的LSD蛋白治疗的个体即将经历、正在经历或已经历这些治疗中的一种或多种。

[0241] MPS I的主要临床表现的治疗或预防包括造血干细胞移植(HSCT),在患有严重的

MPS I的所选儿童2岁之前,该治疗可以增加存活,减少面容粗化和肝脾肿大,改善听力,并且维持正常的心脏功能。HSCT通常不能改善骨骼的临床表现或角膜混浊。HSCT可减慢儿童认知衰退的进程,在移植时造成轻微、但不显著的认知损害。因此,在一些方面,通过本文所述的LSD蛋白治疗的个体即将经历、正在经历或已经历至少一次HSCT。

[0242] MPS I的疾病监测可以取决于多种因素,但可包括婴儿和儿童期早期连续监测头生长;常规正中神经传导速度检测;和在进入小学前对患有较轻的疾病的儿童的教育评估。可以由骨科医生、神经科医师(累及脊髓)、眼科医师、心脏病医师(包括超声波心动图)、听力学家和耳鼻喉科医生进行年度评估。因此,在一些方面,通过本文所述的LSD蛋白治疗的个体即将经历、正在经历或已经历这些疾病监测方案中的一种或多种。

[0243] 对体内用途而言,例如,用于人类疾病的治疗、医学成像或检测,本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白和p97缀合物在给药前通常并入到药物组合物。药物组合物包含一种或多种本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或p97缀合物,并与生理学上可接受的载体或赋形剂相组合。

[0244] 为制备药物组合物,将有效量或需要量的一种或多种基本上脱磷酸化的LSD蛋白或p97缀合物与本领域中技术人员已知的任何适于具体给药模式的药物载体或赋形剂混合。药物载体可为液体的、半液体的或固体的。用于胃肠外、皮内、皮下或局部应用的溶液或悬浮液可包括,例如,无菌的稀释液(诸如水),盐溶液(例如磷酸盐缓冲盐水;PBS),固定油,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂(诸如苄醇和对羟基苯甲酸甲酯);抗氧化剂(诸如抗坏血酸和亚硫酸氢钠)和螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲剂(诸如醋酸盐,柠檬酸盐和磷酸盐)。如果静脉内给药,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),和包含增稠剂和增溶剂的溶液,诸如葡萄糖,聚乙二醇,聚丙二醇和其混合物。

[0245] 可以经由用于执行相似功能的任何可接受的试剂给药模式,进行纯的形式或在适当的药物组合物中的本文所述的多肽和缀合物的给药。通过组合多肽或缀合物或包含缀合物的组合物与适当的生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,可以制备药物组合物,并且可配制为固体的、半固体的、液体的或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉剂、颗粒、膏剂、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气溶胶。另外,其他药物活性成分(包括如本文其他部分所述的其他抗癌剂)和/或合适的赋形剂(诸如盐、缓冲剂和稳定剂)也可存在于组合物中,但并不是必须的。

[0246] 可通过各种不同的途径实现给药,包括经口、胃肠外、经鼻、静脉内、皮内、皮下或局部给药。优选的给药模式取决于要治疗或预防的病症的性质。

[0247] 例如,载体可以包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在所用的剂量和浓度对所暴露的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理学上可接受的载体为水性pH缓冲液。生理学上可接受的载体的实例包括诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸的缓冲剂;包括抗坏血酸的抗氧化剂;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子型表面活性剂,诸如聚山梨醇酯20(TWEEN™)、聚乙二醇(PEG)和泊洛沙姆(PLURONICS™)等。

[0248] 在某些实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白和/或p97多肽序列中每一个,单独

地或作为已存在的缀合物,与颗粒结合或封装在颗粒内,例如纳米颗粒、珠、脂质制剂、脂质颗粒或脂质体,例如免疫脂质体。例如,在具体的实施方案中,p97多肽序列与颗粒表面结合,并且基本上脱磷酸化的LSD蛋白与颗粒的表面结合和/或被封装在颗粒内。在这些和有关的实施方案的一些中,p97多肽和基本上脱磷酸化的LSD蛋白彼此仅经由颗粒自身(例如纳米颗粒,脂质体)共价地或可操作地连接,并且不以任何其他方式彼此共价地连接;即,它们单独地与相同的颗粒结合。在其他实施方案中,p97多肽和基本上脱磷酸化的LSD蛋白首先共价地或非共价地彼此缀合,如本文所述的(例如经由连接子分子),然后与颗粒结合或被封装在颗粒内(例如免疫脂质体,纳米颗粒)。在具体的实施方案中,颗粒为脂质体,并且组合物包含一个或多个p97多肽、一个或多个基本上脱磷酸化的LSD蛋白和脂质的混合物,从而形成脂质体(例如磷脂质,具有表面活性剂特性的混合脂链)。在一些方面,p97多肽和基本上脱磷酸化的LSD蛋白单独地与脂质/脂质体混合物混合,从而使得脂质体结构的形成可操作地连接p97和基本上脱磷酸化的LSD蛋白而不需要共价缀合。在其他方面,如本文所述的,p97多肽和基本上脱磷酸化的LSD蛋白首先共价地或非共价地彼此缀合,然后与脂质混合形成脂质体。在其他的实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白与颗粒结合或被封装在颗粒内(例如纳米颗粒,珠,脂质制剂,脂质颗粒,或脂质体,例如免疫脂质体),没有任何p97多肽。p97多肽、基本上脱磷酸化的LSD蛋白和/或p97-试剂缀合物可以包埋在微胶囊中,所述微胶囊的制备例如在胶体药物递送系统(例如脂质体,白蛋白微球,微乳液,纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中通过凝聚技术或通过界面聚合(例如分别为羧甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)。雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,Oslo,A.,Ed.,(1980)中公开了此类技术。颗粒或脂质体还可以包含其他治疗剂或诊断剂,诸如细胞毒性剂。

[0249] 精确的剂量和治疗持续时间是所治疗疾病的函数,并且可使用已知的检测技术或通过在本领域中已知的模型系统中检测组合物并且由此外推,从而按照经验确定。也可进行受控型临床试验。剂量还可以因待被缓解的状态的严重性而不同。通常以能发挥治疗上有效作用、同时最小化不希望的副作用来制备和给予药物组合物。组合物可一次给药,或可分成许多较小的剂量分时段给药。对任何具体的个体而言,可以根据个体需要随时间调整具体的剂量方案。

[0250] 因此,这些和有关的药物组合物的常规给药途径包括而不限于,口服、局部、经皮、吸入、胃肠外、舌下、颊、直肠、阴道和鼻内给药。本文所用的术语胃肠外包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内注射或输注技术。根据本发明的某些实施方案的药物组合物被配制为以便允许在将组合物给予患者后,其中所含的活性成分是生物可利用的。待给药于个体或患者的组合物可采取一个或多个剂量单元的形式,例如,片剂可为单一剂量单元,气溶胶形式的本文所述的多肽或缀合物的容器可容纳多个剂量单元。制备此类剂型的实际方法对本领域中技术人员是已知的或是显而易见的;例如,见雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。在任何情况下,待给药的组合物包含治疗有效量的本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物,用于治疗感兴趣的疾病或状态。

[0251] 药物组合物可为固体或液体形式。在一实施方案中,载体为颗粒,从而使得组合物为,例如,片剂或粉剂形式。载体可为液体,组合物例如为口服油、可注射的液体或气溶胶,

其例如可用于吸入给药。当用于口服给药时,药物组合物优选地为固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式都包括在本文所认为的固体或液体形式内。

[0252] 作为用于口服给药的固体组合物,药物组合物可制备成粉剂、颗粒剂、压缩片、丸剂、胶囊、咀嚼胶、晶片等。此类固体组合物通常包含一种或多种惰性稀释剂或可食用的载体。另外,可存在以下的一种或多种:粘合剂,诸如羧甲基纤维素,乙基纤维素,微晶纤维素,黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉,乳糖或糊精;崩解剂,诸如海藻酸,海藻酸钠,初生凝胶,玉米淀粉等;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂,诸如胶态二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;增味剂,诸如薄荷,水杨酸甲酯或橙香精;和着色剂。当药物组合物为胶囊形式时(例如,明胶胶囊),除了以上类型的材料外,还可包含液体载体,诸如聚乙二醇或油。

[0253] 药物组合物可为液体形式,例如,酏剂、糖浆、溶液、乳剂或悬浮液。液体可用于口服给药或用于注射递送,这仅是两个实例。当用于口服给药时,除了本发明的化合物之外,优选的组合物包含甜味剂、防腐剂、染色/着色剂和增味剂中的一种或多种。在用于注射给药的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0254] 液体药物组合物,无论它们为溶液、悬浮液或其他相似的形式,可包括下列辅料的一种或多种:无菌稀释剂,诸如注射用水,盐溶液,优选生理盐水,林格氏液,等渗氯化钠,固定油,诸如可用作溶剂或悬浮介质的合成的单甘酯或双甘酯,聚乙二醇,甘油,聚丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,诸如苄醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如醋酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐和用于调整张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。胃肠外制剂可以包装在安瓿、一次性注射器或多剂量的玻璃或塑料小瓶中。生理盐水是优选的辅料。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0255] 用于胃肠外给药或口服给药的液体药物组合物应包含一定量的本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物,从而获得合适的剂量。通常,此量至少为组合物中感兴趣的试剂的0.01%。当用于口服给药时,此量可在组合物重量的0.1%-约70%之间变化。某些口服药物组合物包含约4%-约75%的感兴趣的试剂。在某些实施方案中,根据本发明制备药物组合物和制剂,从而使得胃肠外剂量单元在稀释前按重量计包含0.01%-10%的感兴趣的试剂。

[0256] 药物组合物可用于局部给药,在这种情况下,载体可合适地包含溶液、乳剂、膏剂或凝胶基质。例如,基质可包含以下的一种或多种:矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(诸如水和酒精),以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可存在于用于局部给药的药物组合物中。如果用于跨皮给药,组合物可包括透皮贴剂或离子导入装置。

[0257] 药物组合物可用于直肠给药,例如以栓剂的形式,所述栓剂在直肠中熔化并且释放药物。用于直肠给药的组合物可包含油脂性基质作为合适的无刺激性的赋形剂。此类基质包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0258] 药物组合物可包括改变固体或液体剂量单元的物理形式的各种材料。例如,组合物可包括形成活性成分周围的包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常为惰性的,并且可选自,例如,糖、虫胶和其他肠溶衣试剂。可选地,活性成分可被包在明胶胶囊中。固体或液体形式的药物组合物可包括与缀合物或试剂结合的试剂,并因此协助化合物的递送。在这种能力中发挥作用的合适的试剂包括单克隆或多克隆抗体,一种或多种蛋白或脂质体。

[0259] 药物组合物可基本上由剂量单元组成,可以作为气溶胶给药。术语气溶胶用于表示从胶状性质的系统到由加压包装组成的系统的各种系统。递送可通过液化的或压缩气体或通过合适的分配活性成分的泵系统。气溶胶可以以单相、双相或三相系统递送,以便递送活性成分。气溶胶的递送包括必要的容器、启动器、阀、子容器等,这些共同可形成药盒。本领域中技术人员无需过度实验就可以确定优选的气溶胶。

[0260] 可用保护蛋白免于从体内快速清除的载体制备包含如本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物的组合物,诸如延时释放制剂或包衣剂。此类载体包括受控释放制剂,诸如但不限于,植入物和微胶囊化递送系统,和可生物降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸和本领域中技术人员已知的其他聚合物。

[0261] 可通过药学领域中熟知的方法制备药物组合物。例如,可以通过将包含如本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物组合物和任选的盐、缓冲剂和/或稳定剂中的一种或多种与无菌蒸馏水组合在一起从而形成溶液,制备用于注射给药的药物组合物。可添加表面活性剂以促进均质溶液或悬浮液的形成。表面活性剂为与蛋白非共价地相互作用从而促进蛋白在水性递送系统中的溶解或均质悬浮的化合物。

[0262] 组合物可以以治疗有效量给药,治疗有效量取决于各种因素而变化,包括所用的具体化合物(例如基本上脱磷酸化的LSD蛋白,缀合物)的活性;化合物的代谢稳定性和作用长度;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药的模式和时间;排泄率;药物组合;具体病症或状态的严重性;以及接受治疗的个体。通常,治疗有效的每日剂量(对70kg哺乳动物而言)为约0.001mg/kg(即~0.07mg)-约100mg/kg(即~7.0g);优选地,治疗有效剂量(对70kg哺乳动物而言)为约0.01mg/kg(即~0.7mg)-约50mg/kg(即~3.5g);更优选地,治疗有效剂量(对70kg哺乳动物而言)为约1mg/kg(即~70mg)-约25mg/kg(即~1.75g)。

[0263] 包含如本文所述的基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物的组合物也可与如本文所述的一种或多种其他治疗剂同时给药,在其他治疗剂之前给药,或在其他治疗剂之后给药。例如,在一实施方案中,基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物与抗炎剂一起给药。抗炎剂或药物包括,但不限于,类固醇和糖皮质激素(包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、强的松、去炎松),非甾体类抗炎药(NSAIDs),包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺和霉酚酸酯。

[0264] 此类联合疗法可包括给予包含本发明的化合物的和一种或多种其他活性剂的单一药物剂量制剂,以及给予包含本发明的缀合物的组合物和每一处于其单独的药物剂量制剂的活性剂。例如,如本文所述的缀合物和其他活性剂可以以单一口服剂量组合物(诸如片剂或胶囊)共同给药于患者,或每一药剂以单独的口服剂量制剂给药于患者。相似地,本文所述的缀合物和其他活性剂可以以单一胃肠外剂量组合物(诸如盐溶液或其他生理上可接受的溶液)共同给药于患者,或每一药剂以单独的胃肠外剂量制剂给药于患者。在使用单独的剂量制剂时,包含基本上脱磷酸化的LSD蛋白或缀合物的组合物和一个或多个其他活性剂可以基本上在相同时间(即同时地)或在分别错开的时间(即顺序地和以任何顺序)给药;应理解联合疗法包括所有这些方案。

[0265] 提供下列实施例是为了举例说明的目的,而非限制。

实施例

[0266] 实施例1

[0267] 脱磷酸化的艾杜糖醛酸酶 (dpIDU) 的制备

[0268] 用Affigel固化的土豆酸磷酸酶 (PAP) 处理艾杜糖醛酸酶从而除去磷酸基团。

[0269] Affigel固化的PAP的制备。按照BioRad所提供的用于固化蛋白至Affigel的方案, 将20ml新鲜的Affigel悬浮液置于50ml 聚丙烯螺旋盖的试管中并且用超纯水 (MilliQ H₂O) 洗涤5次。将3毫升H₂O和0.83ml 3M NaOAc (pH 5.2) 添加到约25ml的最终容积。使360mg PAP溶解于10ml的0.1M NaOAc中, 并且保留0.5ml用于核对起始OD280。将PAP溶液添加到Affigel溶液中, 混合, 并且置于摇床上在4℃下孵育过夜。

[0270] 第二天早上, 温和地沉淀凝胶 (例如, 台式离心机400rpm, 1-2秒, 或静置沉淀凝胶)。移除上清液, 并且保留上清液用以核对最终的OD280 (从而核对连接效率)。通过添加20ml 1M Tris HCl/甘氨酸 (pH 5.6), 封闭凝胶上未连接的位点, 在4℃下置于摇床上孵育3小时。从凝胶移除封闭液, 并且用0.1M NaOAc (pH 5.2) +0.01% 聚山梨醇酯80 (吐温80) 洗涤4次。在4℃下将凝胶保存在含0.02% 叠氮化钠的0.1M NaOAc pH5.2+0.01% 聚山梨醇酯80 (吐温80) 中。

[0271] 使用固化的PAP将磷酸基团从IDU移除。从已制备的Affigel-PAP凝胶轻轻倒出缓冲液。为移除叠氮化钠, 用15ml 含0.01% 吐温80 (聚山梨醇酯80) 的0.1M醋酸钠缓冲液 (pH 5.2) 洗涤凝胶4次。此时, 在洗涤之间, 通过在台式离心机中最高400rpm持续1秒离心温和地将凝胶包装。

[0272] 在所有的实验中使用的艾杜糖醛酸酶都来自于Paul Fitzpatrick的PD批次000414, 在OD280处测量为0.66mg/ml。在与Affigel-PAP孵育之前, 充分地将艾杜糖醛酸酶缓冲液交换到0.1M醋酸钠 (pH 5.2) 用以从酸性PBS保存缓冲液去除磷酸基团, 否则其会抑制脱磷酸化。通过用1L 0.1M醋酸钠 (pH 5.2) 过夜透析12ml 0.66mg/ml的IDU (Pierce Slide-analyzer system, 10K MW截留), 进行所有脱磷酸化反应的缓冲液交换。24小时期间更换透析缓冲液2次。

[0273] 对脱磷酸化反应而言, 添加配制于0.1M醋酸钠 (pH 5.2) 和10ml 含0.01% 聚山梨醇酯80的0.1M醋酸钠中的12ml 0.66mg/ml艾杜糖醛酸酶至50ml有螺旋盖的聚丙烯试管中的15ml体积的已制备的Affigel-PAP。在25℃下, 在旋转孵育器上孵育混合物约21-24小时, 在台式离心机中达到400rpm将凝胶轻轻地离心1-2秒。

[0274] 取出含脱磷酸化的IDU的上清液, 用15ml 含0.001% 聚山梨醇酯80的0.1M醋酸钠 (pH5.2) 洗涤凝胶4次, 并且回收所有上清液。汇集上清液 (约70-75ml), 并且在centricon超滤管 (10K截留值) 中浓缩。向IDS试剂缓冲液 (酸性PBS) 进行缓冲液交换, 从而获得约4-5ml的最终容积。添加聚山梨醇酯80达到0.001%的最终浓度。然后用0.22μm过滤器对组合物进行过滤灭菌。

[0275] 实施例2

[0276] p97-脱磷酸化的艾杜糖醛酸酶-2-硫酸酯酶 (DPIDS) 缀合物的制备

[0277] 为制备标记的测试蛋白和缀合物, 通过结合在丙烯酸珠上的牛小肠碱性磷酸酶 (CIP) 的处理来减少磷酸基团的数目, 从重组IDS制备dpIDS。

[0278] 在37℃下,用预平衡的CIP-丙烯酸珠过夜处理重组IDS(4.5ml@1.5mg/ml;产生于人HT-1080细胞),伴随温和的混合。转移CIP珠到柱,收集通过物(FT),用约25ml PBS洗涤珠。收集所有FT和洗涤部分并且浓缩为4.5ml。然后用10mM Tris、50mM NaCl、5mM MgCl₂(pH 8.0)重新平衡CIP珠,并且重复利用于其他子批次的IDS。第一批中产生了29mg CIP处理的dpIDS(脱磷酸化的IDS),将其用于缀合。没有观察到dpIDS特异活性的降低(见表1)。然而,观察到与可溶的甘露糖-6-磷酸酯受体(sM6PR)结合的减少,如通过平板结合测定和通过Biacore分析所测的(见表2,显示了KD2结合亲和力降低7倍,总反应(R_{max})降低2倍)。还观察到甘露糖-6-磷酸(M6P)含量的减少,如通过PAD-HPLC所测(见表3,M6P含量减少17倍或~94-95%)。

[0279] 表1. 特异活性

[0280]

样品	活性 (U/mg)
IDS	6,143
CIP-处理的库R1-R5 (dpIDS)	6,151

[0281] 表2. sM6PR结合的Biacore分析

[0282]

样品	KD1 (M)	KD2 (M)	R _{max} 1 (RU)	R _{max} 2 (RU)
IDS	5.82e-8	8.13e-10	123.2	70.27
dpIDS	3.21e-8	5.94e-9	71.42	43.19

[0283] 表3. 通过PAD-HPLC测量的M6P含量

[0284]

样品	pmol M6P/pmol蛋白
IDS	2.56
dpIDS	0.15

[0285] 对缀合而言,以6.0ml/分钟,在2.6x 33cm葡聚糖凝胶(Sephadex) G25F柱上。将约28mg(19.6ml,浓度1.45mg/ml) dpIDS缓冲交换到0.1M磷酸钾缓冲液(pH 4.5),然后使用两种Vivaspin 2010kDa过滤器进行浓缩。这一过程产生了16.5ml 1.67mg/ml的dpIDS溶液,如UV-可见分光光度法在280nm处所指示的,并且假设在这个波长对1mg/ml dpIDS溶液而言的吸光度为1.33(指示产率=28mg)。进行相似的方案来制备IDS的初始溶液(正常磷酸化的),产生22ml 1.45mg/ml的IDS溶液。然后,将这些蛋白与AlexaFluor 647(AF647)、人p97(黑素转铁蛋白;MTf)或两者缀合,如下文所述。

[0286] AF647合并到dpIDS。向11.6mg(6.96ml) dpIDS溶液(上文)添加2.0mg(400μl)配制于DMSO的5.0mg/ml的AlexaFluor 647琥珀酰亚胺酯溶液的(Invitrogen A20006),相当于AF647:dpIDS比率为10:1。在20℃下允许活化反应进行35分钟,由此产生了粗的AF647标记的dpIDS。移除1.08ml粗反应混合物(包含1.8mg dpIDS)并且在单个葡聚糖凝胶(Sephadex) G25M PD-10柱上纯化到50mM磷酸钾缓冲液+150mM氯化钠(pH 6.7)。这一过程产生了2.5ml的AF647活化的dpIDS溶液。

[0287] 使用Vivaspin 6过滤器渗滤溶液,直到滤液中无可见的颜色,然后浓缩产生1.31ml浓度为1.15mg/ml的dpIDS-AF647溶液,假设在这个波长对1mg/ml dpIDS溶液而言的

吸光度为1.33 (产率=1.5mg), AF647:IDS比率2.08, 假设650nm处AF647的摩尔消光系数为239,000L mol⁻¹cm⁻¹。将该溶液过滤到0.2μm。这种方案也用于合并AF647到正常磷酸化的IDS。

[0288] 马来酰亚胺合并到dpIDS-AF647。向部分粗AF647-标记的dpIDS (9.8mg) 添加0.23mg (113μl) 配制于DMSO的2.0mg/ml 4-[N-马来酰亚胺基甲基] 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC, Thermo 22360) 溶液, 相当于SMCC:dpIDS比率5:1。在20℃下允许dpIDS-AF647活化反应进行60分钟, 然后在20℃下用126μl 10mg/ml 甘氨酸水溶液淬灭15分钟。

[0289] 在2.6x 23cm葡聚糖凝胶 (Sephadex) G50M柱上, 使用50mM磷酸钾、150mM氯化钠和5mM EDTA缓冲液 (pH 7.0) 作为洗脱液, 以6.0ml/分钟纯化粗马来酸亚胺活化的dpIDS-AF647。这一过程产生了14.0ml浓度为0.69mg/ml的马来酸亚胺活化的dpIDS-AF647溶液, 假设在这个波长对1mg/ml dpIDS溶液而言的吸光度为1.33 (产率=9.71mg), AF647:dpIDS比率2.01, 假设650nm处AF647的摩尔消光系数为239,000L mol⁻¹cm⁻¹。使用SAMS-荧光素测定样品中马来酰亚胺的含量, 指示每个dpIDS分子合并1.04个马来酰亚胺基。这种方案也用于合并马来酰亚胺到正常磷酸化的IDS-AF647。

[0290] p97 (MTf) -dpIDS-AF647缀合。在2.6x34cm葡聚糖凝胶 (Sephadex) G25M柱上, 以6.0ml/分钟, 将220mg可溶的p97 (MTf) 缓冲交换到0.1M磷酸钾缓冲液 (pH7.5), 然后使用Vivaspin 2010kDa过滤器浓缩, 从而产生15ml 13.91mg/ml的p97溶液, 如UV-可见分光光度法在280nm处所测得, 假设在这个波长对1mg/ml p97溶液而言的吸光度为1.19 (指示产率=209mg)。

[0291] 对p97的硫醇化而言, 解冻46mg (3.31ml) p97, 并且平衡到室温, 然后添加66μl (0.33mg) 配制于DMSO的5.0mg/ml S-乙酰硫代乙酸和琥珀酰亚胺酯 (SATA, Thermo 26102) 溶液, 相当于SATA:p97比率2.5:1。在20℃下允许S-乙酰硫醇化反应进行60分钟。添加0.05MEDTA二钠盐和2.5M盐酸羟胺 (pH 7.0) 的水溶液 (0.33ml), 用以对硫醇去保护, 并且允许在20℃下进行去保护反应15分钟。

[0292] 在两个一次性PC-10葡聚糖凝胶 (Sephadex) G25M柱上纯化粗硫醇化的p97, 以除去低分子量副产物, 使用50mM磷酸钾、150mM氯化钠、5mM EDTA缓冲液 (pH 7.0) 作为洗脱液,。这一过程产生了6.0ml浓度为7.48mg/ml的硫醇化p97溶液, 如UV-可见分光光度法在280nm处所测, 假设在这个波长对1mg/mlp97溶液而言的吸光度为1.19 (指示产率=45mg)。使用埃尔曼试剂测定样品硫醇含量, 指示每个p97分子的合并0.9个硫醇基。

[0293] 对p97与dpIDS-AF647的缀合而言, 在20℃下允许9.2mg马来酰亚胺活化的dpIDS-AF647和17.8mg硫醇化的p97 (相当于p97:dpIDS比率1.8:1) 在一起反应18小时。通过添加50μl 2.0mg/ml 2-巯基乙醇水溶液 (在20℃下孵育15分钟) 和32μl 10.0mg/ml N-乙基马来酰亚胺水溶液 (在20℃下孵育15分钟) 淬灭缀合反应。

[0294] 使用Vivaspin 20 10kDa过滤器过滤粗缀合物 (~16ml) 至0.2μm并且浓缩为4.0ml。通过高分辨率尺寸排阻色谱, 使用2.6x62cm葡聚糖凝胶 (Superdex) 20PG柱, 以4.0ml/分钟, 50mM磷酸钾缓冲液=150mM氯化钠 (pH 6.7) 作为洗脱液, 纯化浓缩的粗缀合物。这一方案也用于将p97与正常磷酸化的IDS-AF647缀合。

[0295] 实施例3

[0296] 脱磷酸化的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 (dpIDS) 和p97-dpIDU缀合物在脑组织中的分

布

[0297] 进行实验来评估AF647-标记的IDS、dpIDS、p97 (MTf) -IDS缀合物和p97 (MTf) -dpIDS缀合物在脑组织室的分布。根据下表,将AlexaFluor 647 (AF647)-标记的蛋白静脉内注射到小鼠。

[0298] 表4. 用于dpIDS研究的注射剂量

[0299]

试剂	小鼠	大致分子量 (g/mole)	注射剂量 (mg/kg)	注射剂量 (摩尔/kg)
IDS-AF647	3	76,000	6	7.9e-8
^{dp} IDS-AF647	3	76,000	6	7.9e-8
MTf-IDS-AF647	3	158,000	12.5	7.9e-8
MTf- ^{dp} IDS-AF647	3	158,000	12.5	7.9e-8

[0300] 注射标记的测试蛋白后约两个小时,进行心脑灌注用以洗掉来自脑血管的血液而不损伤血脑屏障。这一程序在用于组织学的和生物分布研究的脑解剖和脑组织的制备之前进行。在此,在处死前约10分钟,首先将番茄凝集素(100μg)注射(尾静脉注射)到小鼠。用剂量分别为100mg/kg和10mg/kg的氯胺酮和甲苯噻嗪进行腹腔内注射来麻醉小鼠。然后腹腔内给药约40μL 100单位/mL的肝素。小鼠无意识后,用乙醇使其润湿,并且移除胸廓从而暴露跳动的心脏。使用装配25号针头的1ml注射器通过右心室给小鼠放血。切开腔静脉和/或右心房以允许循环灌注的排出。使用25号针头和灌注泵通过左心室灌注小鼠(4ml/分钟,2-5分钟),直到肝脏看起来已不存在血液。用解剖刀从两眼之间到脖颈划开头皮从而暴露头骨。在枕骨大孔正下方处用解剖刀切断脊髓。用剪刀从枕骨大孔横向地朝着眼睛方向切开头骨并且移除头骨顶部。用弯钳挖出大脑而不损伤组织。

[0301] 然后,沿着矢状平面将大脑切成两半并且称重每一半。将一半包埋在OCT化合物中用于冷冻并且另一半准备用于均质化和组织匀浆中的荧光测量。

[0302] 结果显示在图1、2和5。图1显示静脉内注射(IDS: 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶;dpIDS: 脱磷酸化的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯;MTf-IDS: p97-IDS缀合物;MTf-dpIDS: p97-dpIDS缀合物)后,积聚在小鼠脑实质的受试蛋白的水平。图2显示静脉内注射后,受试蛋白在小鼠的脑实质(BBB内部)和脑毛细血管(BBB外部)之间的分布。图5显示与p97 (MTf) 缀合以及不与p97 (MTf) 缀合的情况下,脑实质中IDS和dpIDS的水平。

[0303] 还使用这些数据进行双因子ANOVA分析。结果显示在下表中。

[0304] 表5. 双因子ANOVA

[0305]

变异来源	自由度	平方和	均方
MTf缀合	1	8.16E-05	8.16E-05
M6P脱磷酸化	1	3.04E-05	3.04E-05
相互作用	1	1.74E-06	1.74E-06
残差(误差)	37	4.00E-05	1.08E-06

总计	40		
----	----	--	--

[0306] p97 (MTf) 缀合实现该结果吗?MTf缀合占总方差的约53.10%。F=75.52。DFn=1。DFd=37。P值<0.0001。如果MTf缀合对总体没有效果,在该规模的实验中随机观察到这么大(或更大)效果的几率小于0.01%。这一效果被认为是极其显著的。

[0307] M6P脱磷酸化效果该结果吗?M6P脱磷酸化占总方差的约19.75%。F=28.09。DFn=1。DFd=37。P值<0.0001。如果M6P脱磷酸化对总体没有效果,在该规模的实验中随机观察到这么大(或更大)效果的几率小于0.01%。这一效果被认为是极其显著的。

[0308] 根据这些数据和分析,相对于正常磷酸化的IDS,脱磷酸化的IDS显示了显著增加的脑实质透入能力。同样,相对于p97和正常磷酸化的IDS之间的缀合物,p97-dpIDS缀合物显示了显著增加的脑实质透入能力。因此,磷酸基团的移除显著地增加了IDS穿过BBB的转运,无论是单独给药还是作为p97缀合物给药。

[0309] 可以组合上文所述的各种实施方案,以便提供其他的实施方案。通过引用,全文并入本说明书所涉及和/或申请资料页所列举的所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物。如有必要,可更改实施方案的各个方面,以便应用各个专利、申请和出版物的构思再提供其他的实施方案。

[0310] 根据上文的详述,可对实施方案做出这些或其他改变。总之,在所附的权利要求中,所用的术语不应当解释为将权利要求限制为说明书中所公开的具体实施方案,权利要求应当解释为包括所有可能的实施方案,以及授予权利的此类权利要求的等同物的全部范围。因此,权利要求并不受公开内容的限制。

序列表

<110> 比奥阿赛斯技术有限公司
 <120> 脱磷酸化的溶酶体贮积症蛋白及其使用方法
 <130> 15C80082CN
 <150> US 61/677,959
 <151> 2012-07-31
 <160> 39
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 1

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr
1 5 10 15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu
20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile
35 40 45

[0001]

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val
50 55 60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
85 90 95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
100 105 110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
115 120 125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
130 135 140

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val
145 150 155 160

Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala
165 170 175

Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp
 180 185 190
 Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr
 195 200 205
 Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val
 210 215 220
 Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr
 225 230 235 240
 Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu
 245 250 255
 Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His
 260 265 270
 Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp
 275 280 285
 Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser
 290 295 300
 His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln
 305 310 315 320
 Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met
 340 345 350
 Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp
 355 360 365
 Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
 370 375 380
 Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
 385 390 395 400
 Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp
 405 410 415
 Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr
 420 425 430

[0002]

Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	His	Tyr	Ala	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	435	440	445	
Asn	Ser	Tyr	Tyr	Val	Val	Ala	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Ser	His	Ala	450	455	460	
Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Gly	Lys	Arg	Ser	Cys	His	Ala	Gly	Phe	465	470	475	
Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Trp	Asp	Val	Pro	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Gln	Arg	485	490	495	
Gly	Phe	Ile	Arg	Pro	Lys	Asp	Cys	Asp	Val	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Glu	500	505	510	
Phe	Phe	Asn	Ala	Ser	Cys	Val	Pro	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Asn	Tyr	Pro	515	520	525	
Ser	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Cys	Val	Gly	Asp	Glu	Gln	Gly	Arg	Asn	Lys	530	535	540	
Cys	Val	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	545	550	555	
[0003]	Arg	Cys	Leu	Val	Glu	Asn	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Arg	His	Thr	565	570	575
Thr	Val	Phe	Asp	Asn	Thr	Asn	Gly	His	Asn	Ser	Glu	Pro	Trp	Ala	Ala	580	585	590	
Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu	Cys	Pro	Asn	Gly	Ala	Arg	595	600	605	
Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Phe	Ala	Ala	Cys	Asn	Leu	Ala	Gln	Ile	Pro	Pro	610	615	620	
His	Ala	Val	Met	Val	Arg	Pro	Asp	Thr	Asn	Ile	Phe	Thr	Val	Tyr	Gly	625	630	635	
Leu	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Asp	Leu	Phe	Gly	Asp	Asp	His	Asn	Lys	Asn	645	650	655	
Gly	Phe	Lys	Met	Phe	Asp	Ser	Ser	Asn	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Leu	Leu	660	665	670	
Phe	Lys	Asp	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Pro	Val	Gly	Glu	Lys	Thr	Thr	675	680	685	
Tyr	Arg	Gly	Trp	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Gly	Met				

	690	695	700
	Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro		
	705	710	715 720
	Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro		
		725	730 735
	Ala Leu		
	<210> 2		
	<211> 525		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 2		
	Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu		
	1	5	10 15
	Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys		
		20	25 30
	Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu		
[0004]	35	40	45
	Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val		
	50	55	60
	Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe		
	65	70	75 80
	Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln		
		85	90 95
	Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe		
		100	105 110
	His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp		
		115	120 125
	Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys		
	130	135	140
	Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro		
	145	150	155 160
	Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser		
		165	170 175

Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser
180 185 190

Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg
195 200 205

Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu
210 215 220

Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
225 230 235 240

Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile
245 250 255

Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg
260 265 270

Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg
275 280 285

Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile
290 295 300

[0005]

Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
305 310 315 320

Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe
325 330 335

Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu
340 345 350

Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro
355 360 365

Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr
370 375 380

Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
385 390 395 400

Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His
405 410 415

Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro
420 425 430

Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro
435 440 445

Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly
450 455 460

Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
465 470 475 480

Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu
485 490 495

Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn
500 505 510

Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro
515 520 525

<210> 3
<211> 653
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

[0006]

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

Gln Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270

[0007]

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

[0008]

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

	<210>	4
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	硫酸酯酶基序
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa =任何氨基酸或不存在
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	Xaa = Cys或Ser
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	Xaa =任何氨基酸
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	Xaa = Pro或Ala
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5)..(5)
[0009]	<223>	Xaa =任何氨基酸
	<400>	4
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
	1	5
	<210>	5
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	硫酸酯酶基序
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa =任何氨基酸或不存在
	<220>	
	<221>	MOD_RES
	<222>	(2)..(2)
	<223>	甲酰甘氨酸
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	Xaa =任何氨基酸或不存在
	<220>	

	<221> MISC_FEATURE <222> (4)..(4) <223> Xaa = Pro或Ala <220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(5) <223> Xaa =任何氨基酸 <400> 5 Xaa Gly Xaa Xaa Xaa 1 5
	<210> 6 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 示例性Gly Ser连接子 <400> 6 Gly Ser Gly Ser 1
[0010]	<210> 7 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 示例性Gly Ser连接子 <400> 7 Gly Gly Ser Gly 1
	<210> 8 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 示例性Gly Ser连接子 <400> 8 Gly Gly Gly Ser 1
	<210> 9 <211> 5 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 示例性Gly Ser连接子

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性Gly Asn连接子

<400> 10

Gly Asn Gly Asn
1

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性Gly Asn连接子

<400> 11

Gly Gly Asn Gly
1

[0011]

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性Gly Asn连接子

<400> 12

Gly Gly Gly Asn
1

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性Gly Asn连接子

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Asn
1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -凝血酶可切割
	<400>	14
	Gly Arg Gly Asp	
	1	
	<210>	15
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -凝血酶可切割
	<400>	15
	Gly Arg Gly Asp Asn Pro	
	1	5
	<210>	16
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0012]	<223>	酶学可降解的连接子 -凝血酶可切割
	<400>	16
	Gly Arg Gly Asp Ser	
	1	5
	<210>	17
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -凝血酶可切割
	<400>	17
	Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys	
	1	5
	<210>	18
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -弹性蛋白酶可切割
	<400>	18
	Ala Ala Pro Val	
	1	

	<210>	19
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -弹性蛋白酶可切割
	<400>	19
	Ala Ala Pro Leu	
	1	
	<210>	20
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -弹性蛋白酶可切割
	<400>	20
	Ala Ala Pro Phc	
	1	
[0013]	<210>	21
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -弹性蛋白酶可切割
	<400>	21
	Ala Ala Pro Ala	
	1	
	<210>	22
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -弹性蛋白酶可切割
	<400>	22
	Ala Tyr Leu Val	
	1	
	<210>	23
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 -基质金属蛋白酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa =任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 23

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -基质金属蛋白酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 24

[0014]

Gly Pro Leu Gly Pro Xaa
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -基质金属蛋白酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 25

Gly Pro Ile Gly Pro Xaa
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -基质金属蛋白酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 26

Ala Pro Gly Leu Xaa
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -胶原酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 27

Pro Leu Gly Pro Asp Arg Xaa
1 5

[0015]

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -胶原酶可切割

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa =任何氨基酸

<400> 28

Pro Leu Gly Leu Leu Gly Xaa
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酶学可降解的连接子 -胶原酶可切割

<400> 29

Pro Gln Gly Ile Ala Gly Trp
1 5

	<210>	30
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 - 胶原酶可切割
	<400>	30
	Pro Leu Gly Cys His	
	1	5
	<210>	31
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 - 胶原酶可切割
	<400>	31
	Pro Leu Gly Leu Tyr Ala	
	1	5
	<210>	32
	<211>	7
	<212>	PRT
[0016]	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 - 胶原酶可切割
	<400>	32
	Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg	
	1	5
	<210>	33
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 - 胶原酶可切割
	<400>	33
	Pro Leu Ala Tyr Trp Ala Arg	
	1	5
	<210>	34
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	酶学可降解的连接子 - 基质溶素可切割

<400> 34

Pro Tyr Ala Tyr Tyr Met Arg
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 酶学可降解的连接子 - 明胶酶可切割

<400> 35

Pro Leu Gly Met Tyr Ser Arg
1 5

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 酶学可降解的连接子 - 血管紧张素转换酶可切割

<400> 36

Gly Asp Lys Pro
1

[0017]

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 酶学可降解的连接子 - 血管紧张素转换酶可切割

<400> 37

Gly Ser Asp Lys Pro
1 5

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 酶学可降解的连接子 - 组织蛋白B可切割

<400> 38

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

- [0018] <213> 人工序列
- <220>
- <223> 酶学可降解的连接子 -组织蛋白B可切割
- <400> 39
- Gly Phe Leu Gly
- 1

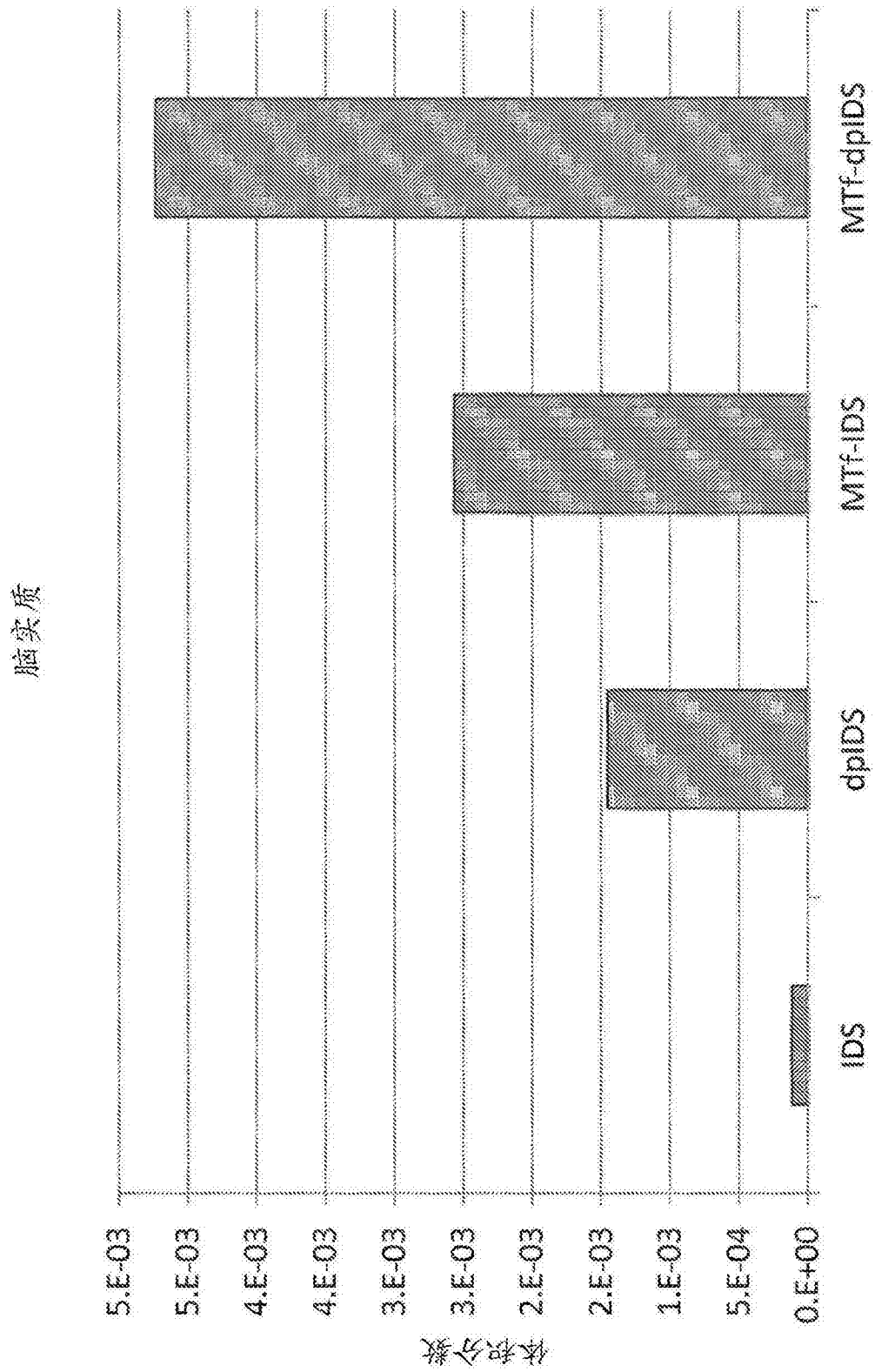


图1

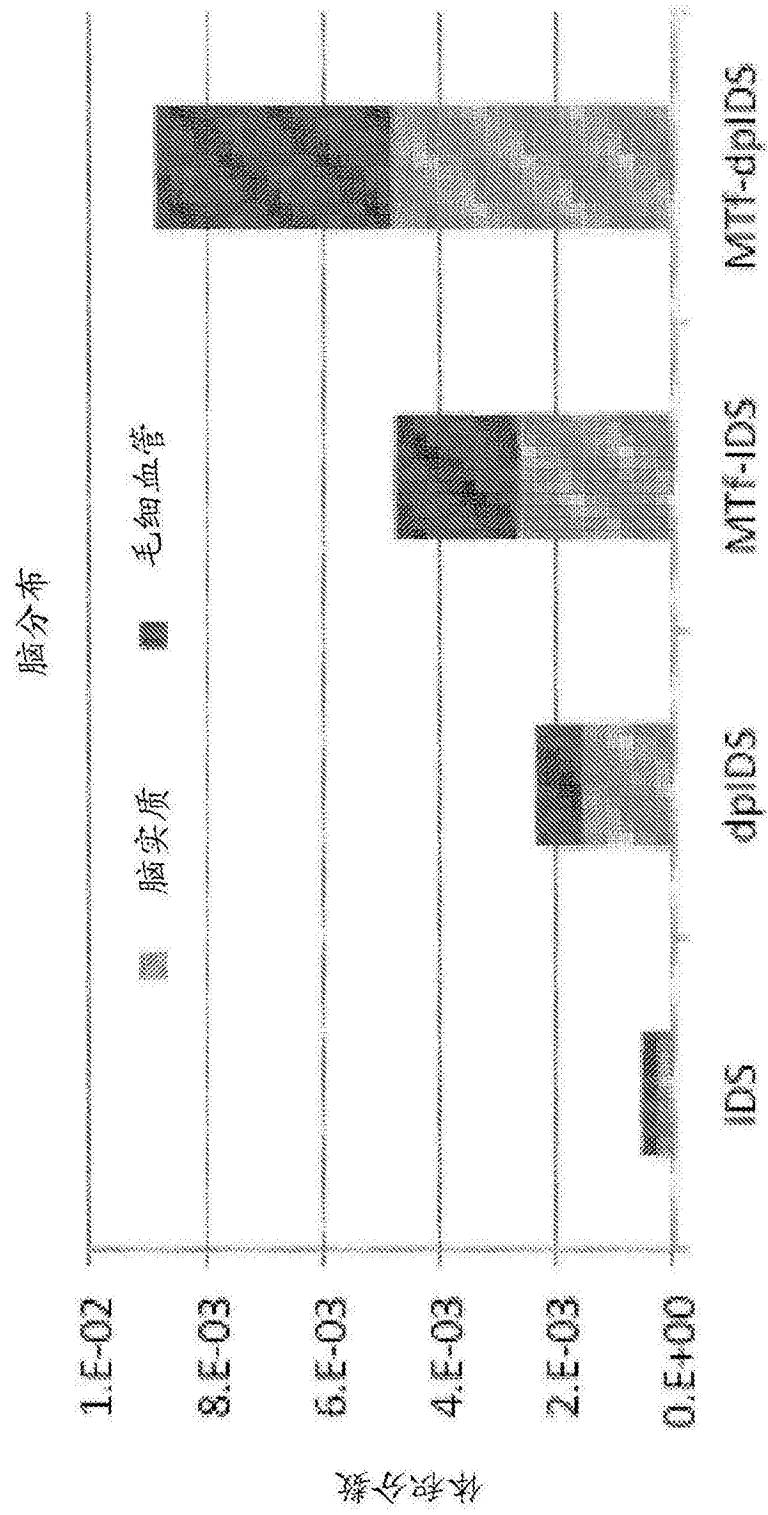


图2

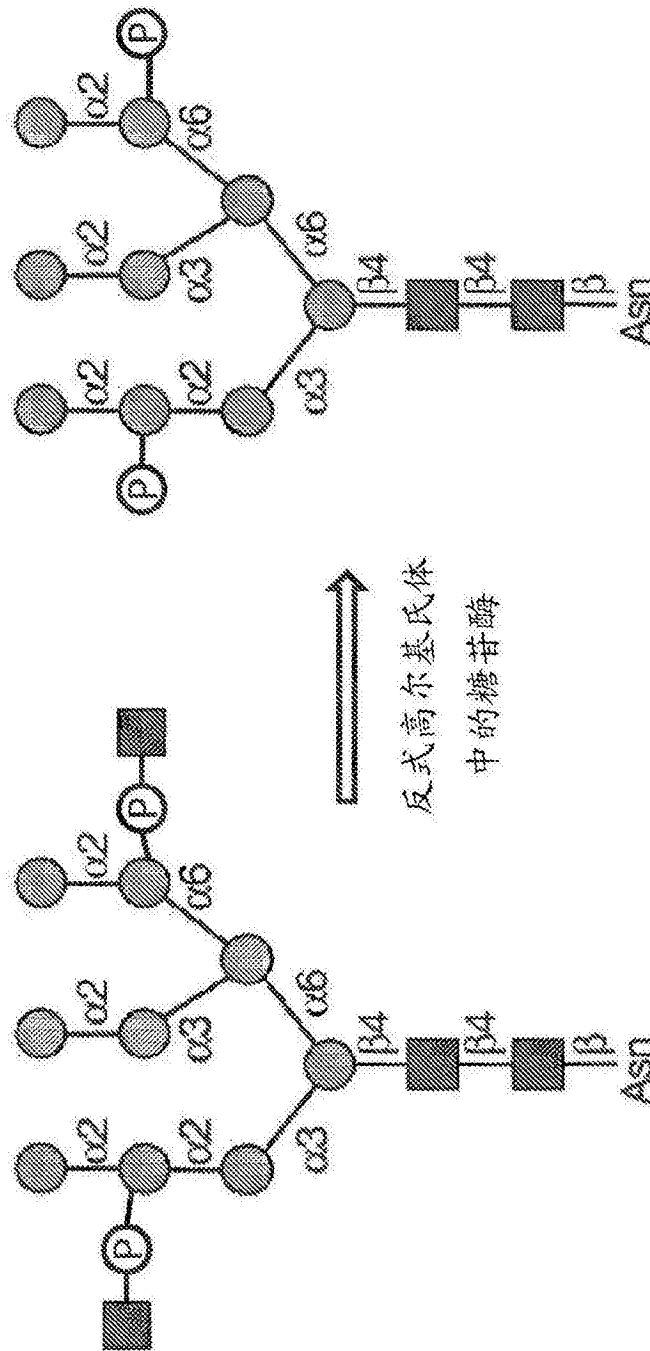


图4

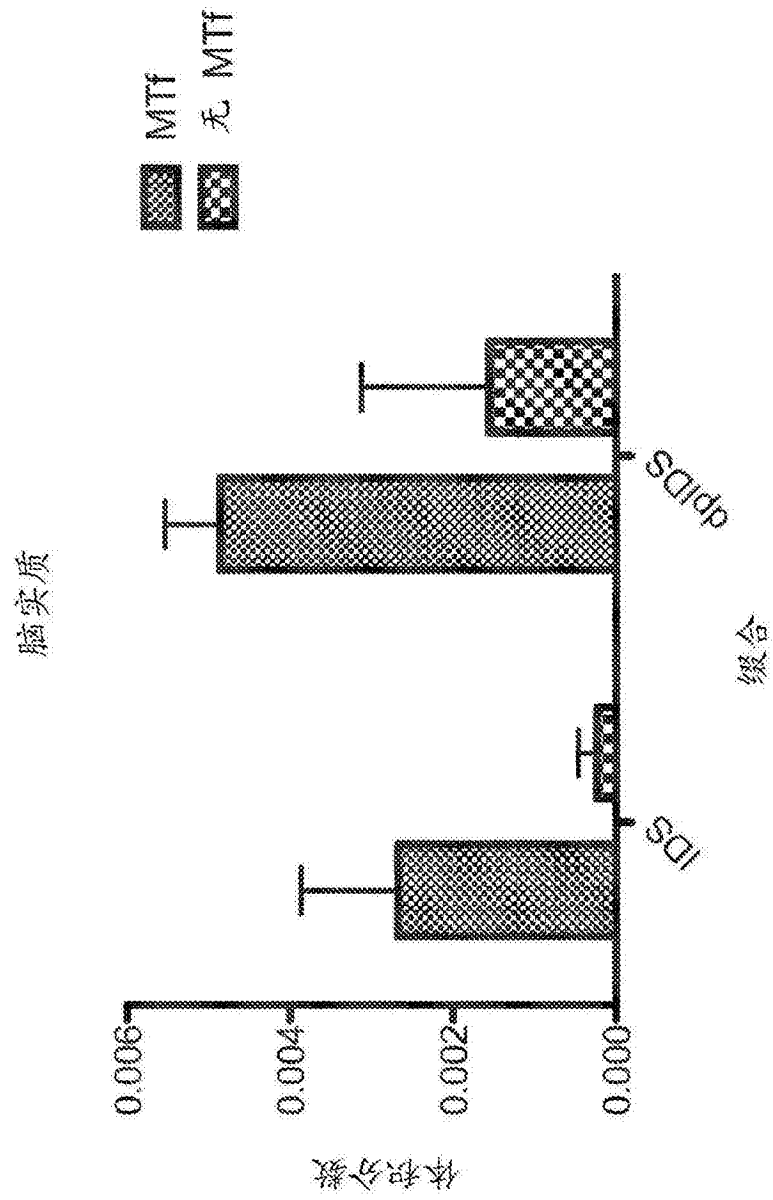


图5

艾杜硫酸酯酶的氨基酸序列

1 Ser Glu Thr Gln Ala [K203] Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu His Ile Val Asp
 21 Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gln Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Lys Asp
 41 Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Gln Asn Ala Phe His Gln Gln Ala Val Cys His
 61 Pro Ser Arg Val Ser Ser Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 81 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly [K204] Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Gln
 101 Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser [K205] His
 121 Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Tyr His Pro Ser Ser Gln Lys Tyr
 141 Gln Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Gln Ser His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
 161 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Gln Gly Ser Leu Pro Asp Tyr Gln Ser Thr Gln Gln Ala
 181 His Gln Leu Leu Gln Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Ser His Val Gly Tyr
 201 His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Gln Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Gln
 221 [K206] Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Gln Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
 241 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Asp Val Gln Ala Leu [K207] Ala Ser Val Pro Tyr
 261 Gly Pro Ile Pro Val Asp Thr Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe His Ser Val Ser
 281 Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala [K208]
 301 Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Gln His Gly Gln Trp
 321 Ala Lys Tyr Ser Asn Thr Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly
 341 Arg Thr Ala Ser Leu Pro Gln Ala Gly Gln Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp
 361 Ser Ala Ser Gln Leu Met Gln Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Gln Leu Val Ser
 381 Leu Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 401 Ser Phe His Val Gln Leu Cys Arg Gln Gly Lys Asn Leu Lys His Phe Arg His Arg
 421 Asp Leu Gln Gln Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Gln Leu Ile Ala Tyr Ser Gln
 441 Tyr Phe Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile
 461 Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Phe Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly His
 481 Asn Pro Asp Gln Phe Leu Ala [K209] Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Gln Leu Tyr Phe Val
 501 Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Asn Tyr [K210] Asp Ser Gln Gly Asp Leu Phe
 521 Gln Leu Leu Met Pro

[K203]、[K204]、[K205]、[K206]、[K207]、[K208]、[K209]、[K210] 标记N-连接的糖基化的位点

图6