



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110381987 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201880016068.5

(22)申请日 2018.01.05

(30)优先权数据

62/442,537 2017.01.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2018/050018 2018.01.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/127920 EN 2018.07.12

(71)申请人 波塔力克斯有限公司

地址 以色列卡梅尔市

(72)发明人 埃纳特·阿尔蒙

罗尔·切尔特科夫 萨里·阿隆

尤瑟夫·雪提尔

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51)Int.Cl.

A61K 38/47(2006.01)

C12N 9/24(2006.01)

权利要求书3页 说明书33页

序列表5页 附图7页

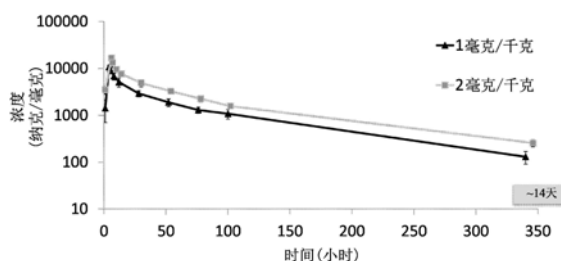
(54)发明名称

使用稳定化 α -半乳糖苷酶治疗法布里病的治疗方法

(57)摘要

本发明揭示了通过以稳定化的植物重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白进行给药来治疗法布里病的方法,所述稳定化的植物重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白包括通过一连接部分而彼此共价连接的至少两个 α -半乳糖苷酶单体;以及所述蛋白质的多种单位剂量亦揭示于此。于临床设定中在Gb3积聚、疼痛及多个GI参数的减少、肾脏及心脏稳定性的多个方面上,本发明揭示的多个操作流程是安全的,在多个给药之间具有多个大于2周的间隔,以及在患者的多个疾病参数中表现出的重要改善。

血浆中的佩冈尼半乳糖苷酶 α (pegunigalsidase α)的浓度对于时间



1. 一种治疗有需要的一人类对象的法布里病的方法,其特征在于:所述方法包括:向所述对象以一治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药,其中所述治疗有效量的所述重组人类 α -半乳糖苷酶为0.2至2.0毫克/公斤,从而治疗所述对象的法布里病,其中所述给药以大于两周的间隔进行,并且其中所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过长度为20至600个原子的一连接部分彼此共价连接。

2. 一种治疗有需要的一人类对象的法布里病的方法,其特征在于:所述方法包括向所述对象以一治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药,其中所述所述治疗有效量的所述重组人类 α -半乳糖苷酶为0.2至2.0毫克/公斤,从而治疗所述对象的法布里病,其中所述给药以大于两周至每隔四周的间隔进行,并且其中所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过长度为20至600个原子的一连接部分彼此共价连接。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶为一植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述植物重组人类 α -半乳糖苷酶与双-NHS-PEG₄₅交联。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶包括:一人类 α -半乳糖苷酶蛋白,具有如SEQ ID NO:1至3中任一个所示的一氨基酸序列。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于:所述人类 α -半乳糖苷酶蛋白如SEQ ID NO:2或3所示。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为三周至四周。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为17天至8周。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为17天至6周。

10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为17天至5周。

11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为3周至6周。

12. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为4周至6周。

13. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述间隔为4周至5周。

14. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药为静脉内给药。

15. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药以1.0毫克/公斤的一剂量进行。

16. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药以2.0毫克/公斤的一剂量进行。

17. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药为每三周进行一次。

18. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药为每四周进行一次。

19. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药为每五周进行一次。

20. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述给药为每六周进行一次。

21. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶降低所述对象中的Gb3及/或溶酶体Gb3。

22. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中的多个心脏参数的稳定性,或减弱所述多个心脏参数的恶化。

23. 如权利要求22所述的方法,其特征在于:所述多个心脏参数为通过MRI测量与多个治疗前的数值相比的LVM或LVMI。

24. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶

维持所述对象中的至少一个参数的稳定性,所述至少一个参数选自于由所述对象中的多个血浆Gb3浓度的降低、多个溶酶体-Gb3浓度的降低及多个尿液Gb3浓度的减少所组成的一群组。

25.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶减轻所述对象中与法布里病相关的肾功能恶化。

26.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中的肾功能的稳定性。

27.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中的至少一个胃肠道参数的稳定性,或减弱所述至少一个胃肠道参数的恶化。

28.如权利要求27所述的方法,其特征在于:所述胃肠参数为在治疗6个月后测量并与多个治疗前的数值相比的腹痛及/或腹痛频率。

29.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象的美因茨严重性评分指数的稳定性,或减弱所述美因茨严重性评分指数的恶化。

30.如权利要求29所述的方法,其特征在于:所述美因茨严重性评分指数的降低是在治疗6个月后进行测量并与治疗前的数值进行相比。

31.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少5小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

32.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少20小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

33.如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少50小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

34.如权利要求1所述的方法,其特征在于:在给药1毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少5000纳克/毫升的一 $C_{\text{最大值}}$ 。

35.如权利要求1所述的方法,其特征在于:在给药2毫克/公斤后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少8000纳克/毫升的 $C_{\text{最大值}}$ 。

36.如权利要求1所述的方法,其特征在于:在给药1.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少100,000纳克*小时/毫升的一生物利用度($AUC_{0-\infty}$)。

37.如权利要求1所述的方法,其特征在于:在给药2.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少400,000纳克*小时/毫升的一生物利用度($AUC_{0-\infty}$)。

38.一种单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂包含2.0至500毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

39.如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂包括10毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

40.如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂包括50毫克的植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

41. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂包括100至180毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

42. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂包括150毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

43. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂被配制为一液体。

44. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述单位剂量调剂被配制为用于静脉内给药。

45. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过聚(亚烷基)二醇连接部分而彼此共价连接。

46. 如权利要求45所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述聚(亚烷基)二醇连接部分包括至少20个亚烷基。

47. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶是一植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

48. 如权利要求47所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述植物重组人类 α -半乳糖苷酶是与双-NHS-PEG₄₅交联的植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

49. 如权利要求38所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述重组人类 α -半乳糖苷酶包括:一人类 α -半乳糖苷酶蛋白,具有SEQ ID NO:1至3中任一所示的一氨基酸序列。

50. 如权利要求49所述的单位剂量调剂,其特征在于:所述人类 α -半乳糖苷酶蛋白如SEQ ID NO:2或3中所示。

使用稳定化 α -半乳糖苷酶治疗法布里病的治疗方法

[0001] 技术领域及背景技术

[0002] 在本发明的一些实施例中,涉及 α -半乳糖苷酶的多个同型二聚体蛋白质结构,以及特别地但不限于,通过酶替代疗法用 α -半乳糖苷酶的多个稳定化共价连接的同型二聚体蛋白质结构治疗法布里病的有效治疗方法。

[0003] 所述溶酶体酶 α -半乳糖苷酶-A(α -GAL或 α -Gal A;EC 3.2.1.22)在多个大分子的分解代谢过程中催化半乳糖从寡糖、糖蛋白及糖脂的移除,溶酶体酶的多个缺陷导致溶酶体酶的基质在多种组织中积聚,称为多个溶酶体贮积病的多个病症。在人类中,缺乏功能性 α -半乳糖苷酶-A导致含有多个末端 α -半乳糖残基(主要是球形三酰基神经酰胺,其也被称为“神经酰胺三己糖苷”、“CTH”或“Gb3”)的多个糖脂积聚在所述多个组织中,导致法布里病。法布里病是一种X连锁隐性疾病,首次描述于1898年,其特征为慢性疼痛、眼部混浊、肝及肾损伤、皮肤损伤、血管恶化及/或心脏缺陷。重组人类 α -半乳糖苷酶-A具有提供及替代多个患者中的所述下降的酶活性能力,并且使用 α -GAL的酶替代疗法(ERT)在2003年在美国及欧洲国家被批准用于治疗法布里病, α -GAL成为 β -葡萄糖苷酶后被批准用于治疗一溶酶体贮积症的第二种重组蛋白,所述 β -葡萄糖苷酶是用于戈谢病的一种治疗方法。

[0004] 多个内源性及重组 α -GAL酶催化在皮肤、肾脏、心脏等多个器官的多个细胞的多个溶酶体中多个末端半乳糖基化糖脂的水解,所述天然作用环境的特点是酸性pH值低至4.5,因此,溶酶体酶(包括 α -GAL)被设计在所述多个低pH水平下发挥其最大活性。

[0005] 多个目前的法布里ERT治疗方法是基于哺乳动物细胞衍生的重组 α -GAL,所述哺乳动物细胞衍生的重组 α -GAL被认为具有有限的临床功效,并且目前不能为多个法布里患者提供一个令人满意的临床解决方案。

[0006] X射线结构分析显示人类 α -GAL是一种每一单体由两个结构域组成的同源二聚体糖蛋白,一个(β/α)₈结构域含有活性位点,以及一个C末端结构域含有8个位于的一 β 夹心的两个折叠上的反平行 β 链[Garman及Garboczi,分子生物学杂志,2004年,337:319-335]。

[0007] 结构(X射线晶体学)及生物化学(动力学)证据都表明所述同型二聚体结构的所述多个单体单元之间的活性位点协同性,强调二聚化对多个治疗性 α -GAL组合物的酶活性及稳定性的重要性。

[0008] 由本受让人的W02009/024977,通过引用并入本说明书中,如同在本说明书中完整阐述,教导了糖与生物分子的多个缀合物,通过一非疏水性接头(linker)共价连接在所述糖与所述生物分子之间,以及教导了利用所述缀合物的多个医学用途。

[0009] 本受让人的W02011/061736,通过引用并入本说明书中,如同在本说明书中完整阐述,教导了多种利用 α -半乳糖苷酶的方法,所述 α -半乳糖苷酶在高于溶酶体pH值的多个pH水平下表现出一溶酶体活性。

[0010] 本受让人的W02011/107990,其通过引用并入本说明书中,如同在本说明书中完整阐述,教导了一种共价连接的多聚体蛋白质结构,所述共价连接的多聚体蛋白质结构包含至少两个 α -半乳糖苷酶单体的,其在生理条件下具有强大的 α -半乳糖苷酶催化活性及增强的药效动力学,及其治疗用途的建议。

[0011] 本受让人的W02012/098537,其通过引用并入本说明书,如同在本说明书中完全阐述,教导了多种用于在多个植物中重组表达一具有催化活性 α -半乳糖苷酶的核酸构建体,以及对所述多个核酸构建体的治疗用途的多个建议。

[0012] 其他背景技术包括Bendele等人[毒理学科学1998年,42:152至157]、美国专利第5,256,804号、第5,580,757号及第5,766,897号、国际专利申请第PCT/NL2007/050684号(公开为第W0 2008/075957号)、Tresco等人的美国专利公开号US20160184409以及Seely及Richey[色谱法杂志A,2001年,908:235至241]。

发明内容

[0013] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种治疗有需要的一人类对象的法布里病的方法,所述方法包括:向所述对象以一治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药,其中所述治疗有效量的所述重组人类 α -半乳糖苷酶为0.2至2.0毫克/公斤,从而治疗所述对象的法布里病,其中所述给药以大于两周的间隔进行,并且其中所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过长度为20至600个原子的一连接部分彼此共价连接。

[0014] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种治疗有需要的一人类对象的法布里病的方法,所述方法包括向所述对象以一治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药,其中所述治疗有效量的所述重组人类 α -半乳糖苷酶为0.2至2.0毫克/公斤,从而治疗所述对象的法布里病,其中所述给药以大于两周至每隔四周的间隔进行,并且其中所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过长度为20至600个原子的一连接部分彼此共价连接。

[0015] 根据本发明一些实施方案的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶是一植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0016] 根据本发明一些实施例的一方面,所述植物重组人类 α -半乳糖苷酶与双-NHS-PEG₄₅交联。

[0017] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为三周或四周。

[0018] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为17天至8周。

[0019] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为17天至6周。

[0020] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为17天至5周。

[0021] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为3周至6周。

[0022] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为3周至5周。

[0023] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为3周至4周。

[0024] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为4周至6周。

[0025] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述间隔为4周至5周。

[0026] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药为静脉内给药。

[0027] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药以1.0毫克/公斤的一剂量进行。

[0028] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药以2.0毫克/公斤的一剂量进行。

[0029] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药为每三周进行一次。

[0030] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药为每四周进行一次。

[0031] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药为每五周进行一次。

[0032] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述给药为每六周进行一次。

[0033] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶降低所述对象中的Gb3及/或溶酶体Gb3。

[0034] 根据本发明一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中的多个心脏参数的稳定性,或减弱所述多个心脏参数的恶化。

[0035] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述多个心脏参数为通过MRI测量与多个治疗前的数值相比的LVM或LVMI。

[0036] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中血浆Gb3及/或溶酶体-Gb3浓度降低的稳定性。

[0037] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中尿液Gb3浓度降低的稳定性。

[0038] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶减轻所述对象中与法布里疾病相关的肾功能恶化。

[0039] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象中的肾功能的稳定性。

[0040] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象的至少一种胃肠参数的稳定性,或减弱所述至少一个胃肠道参数的恶化。

[0041] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述胃肠参数为在治疗6个月后测量并与多个治疗前的数值相比的腹痛及/或腹痛频率。

[0042] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述治疗有效量的重组人类 α -半乳糖苷酶维持所述对象的美因茨严重性评分指数的稳定性,或减弱所述美因茨严重性评分指数的恶化。

[0043] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述美因茨严重性评分指数的降低是在治疗6个月后进行测量并与治疗前的数值进行相比。

[0044] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少5小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

[0045] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少20小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

[0046] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶在给药后具有至少50小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

[0047] 根据本发明的一些实施例的一方面,在给药1毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少5000纳克/毫升的一 $C_{\text{最大值}}$ 。

[0048] 根据本发明的一些实施例的一方面,在给药2毫克/公斤后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少8000纳克/毫升的 $C_{\text{最大值}}$ 。

[0049] 根据本发明的一些实施例的一方面,在给药1.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少100,000纳克*小时/毫升的一生物利用度($AUC_{0-\infty}$)。

[0050] 根据本发明的一些实施例的一方面,在给药2.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶后,所述重组人类 α -半乳糖苷酶具有至少400,000纳克*小时/毫升的一生物利用度($AUC_{0-\infty}$)。

[0051] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种单位剂量调剂,所述单位剂量调剂包含2.0至500毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0052] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂包括10毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0053] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂包括50毫克的植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0054] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂包括100至180毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0055] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂包括150毫克的重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0056] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂被配制为一液体。

[0057] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述单位剂量调剂被配制为用于静脉内给药。

[0058] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过聚(亚烷基)二醇连接部分而彼此共价连接。

[0059] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述聚(亚烷基)二醇连接部分由至少20个亚烷基组成。

[0060] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶是一植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0061] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述植物重组人类 α -半乳糖苷酶是与双-NHS-PEG₄₅交联的植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0062] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述重组人类 α -半乳糖苷酶包括:一人类 α -半乳糖苷酶蛋白,具有SEQ ID NO:1至3中任一个所示的一氨基酸序列。

[0063] 根据本发明的一些实施例的一方面,所述人类 α -半乳糖苷酶蛋白如SEQ ID NOs:2或3中所示。

[0064] 除非另加说明,否则本说明书所使用的所有技术术语及/或科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。虽然本发明的实施方式可以通过类似或等同于本发明的实施方式所述的任何方法及材料实施或测试,本发明的实施方式、列举的方法及/或材料已在下面描述。在冲突的情况下,将以本专利说明书并且包括定义为准。此外,材料、方法及实施方式仅是举例性质,并且不必然用以限制。

附图说明

[0065] 本发明的一些实施例在此仅通过举例的方式并参考多个附图来描述,通过详细说明附图具体的参考资料,应当强调所示的细节仅为举例,用以说明本发明实施例的目的。基于这点,结合所述附图及描述使得本领域技术人员能清楚的实施本发明的实施例。

[0066] 在附图中:

[0067] 图1是示出由所述治疗的开始(第1天)至给药后14天的多个患者的血浆中测量的植物重组人类 α -GAL交联双-NHS-PEG₄₅(pegunigalsidase alfa,下文简称为佩冈尼半乳糖

苷酶 α)的一药物代谢动力学图谱的一曲线图,以每毫升(ml)血浆中的纳克(ng)的佩冈尼半乳糖苷酶 α 表示。在随后的所述佩冈尼半乳糖苷酶 α 给药之前,对在0小时(给药前/注射前)、1小时(给药开始后1小时)、所述给药结束时(输注)(E0I)、在所述E0I后的1、4、8、24、72、96小时、及在给药(“C_{2wk}”)后2周(14天)时抽取的多个血液样品测量酶浓度。所述曲线图表示在一对数标度上在14天期间的多个不同的采样时间的所有群组的平均血浆值(纳克/毫升(ng/ml))。多个三角形(浅灰色线)代表1.0毫克/公斤的一剂量,而多个方形(黑线)代表2.0毫克/公斤的佩冈尼半乳糖苷酶 α ;

[0068] 图2是大众可获得的一药物代谢动力学(PK)曲线图,示出了商业上可获得阿加糖酶 β (r-alphaGalA,哺乳类动物细胞重组人类 α -GAL A,法布瑞酶(FabrazymeTM),健赞公司,剑桥,马萨诸塞州)在开始给药(输注)后大约10小时(600分钟)后在一对数标度上的药物代谢动力学图谱。所述数据是来自于美国人类遗传学杂志,68,711至722,2001年。注意阿加糖酶 β 的所有浓度的短期(约10小时)生物利用度是与在相似剂量的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个浓度的短期生物利用度进行比较(以天数为测量单位)(见图1);

[0069] 图3A至3C是示出了佩冈尼半乳糖苷酶 α 的药物代谢动力学多个参数的多个直方图,以最大血浆浓度(C_{最大值}(C_{max}),以纳克/毫升计)表示(图3A),半衰期(T_{1/2},以多个小时计)(图3B)并计算总有效酶(所述曲线下的面积,AUC_{0-∞},以毫克*分钟/毫升计)(图3C),与可取得的阿加糖酶 β (r-alphaGalA,法布瑞酶(FabrazymeTM))及阿加糖酶 α (利甫盖素(Replagal))的公开数据进行比较(夏尔人类基因治疗(HGT),公司,剑桥,马萨诸塞州)。所示的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个剂量为1.0及2.0毫克/公斤、阿加糖酶 β 的剂量为1.0毫克/公斤及阿加糖酶 α 的剂量为0.2毫克/公斤。注意,与阿加糖酶 α 或 β 相比,佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所有参数(C_{最大值};T_{1/2}及AUC_{0-∞})的所述多个药物代谢动力学更高;

[0070] 图4A至4B为在一个4周的时间段内的酶来自于单次输注的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的有效性模型的多个图示,将有效性模型与佩冈尼半乳糖苷酶 α 的一延长方案(2毫克/公斤,每4周一次)与阿加糖酶 β (法布瑞酶)(1毫克/公斤,每2周一次)的所述标准方案的建模进行比较。图4A是表示所述单次输注后在一四周的时间段内的外推的酶有效性的一示意图。

[0071] 图4B为在一个4周间隔内给予一次2毫克/公斤的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的药物代谢动力学参数与在所述相同的4周间隔给予两次1毫克/公斤的阿加糖酶 β (Fabrazyme)的药物代谢动力学参数之间的多个比较的一模型。

[0072] 图4B表示每4周给药一次2毫克/公斤的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的4周酶有效性(每连续一周计算的部分AUC)与每2周给药一次1毫克/公斤阿加糖酶 β (法布瑞酶)的所述部分AUC的比较。注意与在所述整个4周内单次给药佩冈尼半乳糖苷酶 α 后所述预测的显着酶有效性相比较,在给药后所述一周内阿加糖酶 β 酶的部分AUC实际上不存在(参见第2周及第4周的阿加糖酶 β)。

具体实施方式

[0073] 在本发明的一些实施方案中,本发明涉及一稳定化共价连接的人类 α 半乳糖苷酶的同型二聚体酶,更具体地但不限于,涉及一稳定的共价连接的植物重组人类 α 半乳糖苷酶,其用于通过酶替代疗法治疗在多个人类对象中的法布里病的多个有效治疗方法。

[0074] 在详细解释本发明的至少一个实施例之前,应当理解本发明不一定限于本发明在以下描述的细节或所举例的多个实施例。本发明能够以其他实施例或以各种方法来实施或应用。

[0075] 一溶酶体蛋白的多个不足(例如:在一溶酶体蛋白中的多个缺陷或一溶酶体蛋白的一缺乏)可对一对象的健康造成相当大的危害(一溶酶体贮积病)。以所述缺乏的蛋白质对一患者进行给药的酶替代疗法(ERT)已被用于治疗多个溶酶体贮积病的多个尝试中。然而,所述缺乏蛋白质的给药不一定导致所述给药的蛋白质在体内具有一显着及/或持久的活性。

[0076] 法布里病是一X连锁隐性(遗传)溶酶体贮积病的一个示例,所述法布里病可引起多种症状。由多个突变导致的所述溶酶体酶 α -半乳糖苷酶-A的一缺乏导致被称为球形三酰基神经酰胺(也称为Gb₃或神经酰胺三己糖苷)的一糖脂积聚在多个血管、其他多个组织及多个器官内,所述积聚导致所述糖脂的正常功能受损。两种酶替代疗法(ERTs)可用于功能性补偿 α -半乳糖苷酶缺乏症。阿加糖酶 α (利甫盖素(Replagal®),夏尔)及阿加糖酶 β (阿加糖酶(Fabrazyme®),健赞-赛诺菲)两者皆是所述人类 α -半乳糖苷酶A酶的多个重组形式,阿加糖酶 α 及阿加糖酶 β 两者皆具有短的半衰期,所述短的半衰期导致有限的生物利用度,并导致一不令人满意的临床结果。

[0077] 在解决 α -半乳糖苷酶的所述受损活性的一需求的驱使下,开发了多个稳定化形式的 α -半乳糖苷酶(α -GAL),所述多个稳定化形式的 α -半乳糖苷酶(α -GAL)在多个溶酶体条件及一血清环境中表现出增强的活性及/或一更持久的活性,表明在多个临床相关条件下,所述蛋白质在体内具有潜在的持久增强的活性。此外,本发明的所述共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个法布里患者的血清中表现出增强的活性及/或一更持久的活性。

[0078] 使用本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,本发明的多位发明人已开发了多种用于在多个人类中的法布里病的酶替代疗法的有效新型治疗剂量及多个方案。使用本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的临床经验表明,根据所述多个新的治疗方法,以本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行的ERT对于人类的法布里病的治疗是安全且有效的。本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶展现出显着增强的药物代谢动力学,在给药后维持多个血浆浓度超过10天,与目前可获得的多个ERT相比,在1.0纳克/毫升剂量(7,900至23,000纳克/毫升)下有大于5,000纳克/毫升的C_{最大值}(C_{max}),而在2.0毫克/公斤的剂量(13,900至46,500纳克/毫升)下有大于8,000纳克/毫升的C_{最大值}及增强的生物利用度(AUC)。

[0079] 以本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行的治疗减少了肾小管周围毛细血管多个神经酰胺酶三己糖苷包涵体,所述多个神经酰胺酶三己糖苷包涵体显著地减弱了肾功能的所述特征恶化、改善了肾功能及多个胃肠道症状、降低了患者的多个疼痛指数评分、改善或稳定了患者的多个心脏功能、以及改善身体活动及整体生活质量。由于本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述改善的药物代谢动力学及生物利用度,例如在所述多个临床研究中所观察到的临床改善,使用多个更宽的输注间隔的一有效的2毫克/公斤剂量方案可以提供ERT涵盖到特定的法布里群体(例如但不限于:轻度至中度、年轻、早期诊断及/或稳定的多个患者),因此在管理所述患者的多个症状的同时,提

供更大的治疗便利性及患者依从性,导致患者在生活品质上的显著改善及延迟多个疾病并发的风险。

[0080] 因此,根据本发明一些实施例的一方面,提供了在有需要的一人类对象中治疗法布里病的一方法,所述方法包括向所述对象以一治疗有效量的共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药,其中所述共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶的所述治疗有效量为0.2至2.0毫克/公斤,从而治疗所述对象的法布里病,其中所述给药以大于两周至每四周的多个间隔实施,并且其中所述共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶的所述多个单体是通过一聚(亚烷基)二醇连接部分彼此共价连接。

[0081] 根据一些实施例,所述共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶是一共价连接的同型二聚体植物重组人类 α -半乳糖苷酶。

[0082] 根据一些实施例,所述共价连接的同源二聚体植物重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白的特征为具有一稳定性比天然 α -半乳糖苷酶的一稳定性更高、及/或具有一初始活性比天然 α -半乳糖苷酶的一初始活性更高,如下文详细描述。在一些实施例中,所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白是一植物重组人类 α -GAL交联双-NHS-PEG₄₅。

[0083] 应当注意,在一些实施例中,所述方法可使用稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白来实现,所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白包含衍生自多个非植物(例如:哺乳动物)细胞的一重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白,例如:可商业性获得的阿加糖酶 α (利甫盖素(Replagal®),夏尔)及阿加糖酶 β (法布瑞酶(Fabrazyme®),健赞),在多个非哺乳动物细胞(植物、细菌、昆虫、真菌等)中产生的重组 α -半乳糖苷酶或任何其他来源的合适的 α -半乳糖苷酶。

[0084] 如本说明书中所用,“法布里病”是指任何 α -半乳糖苷酶A缺乏。“ α -半乳糖A缺乏”是指一患者中的 α -半乳糖苷酶A在所述天然活性中的任何缺乏,导致主要在多个毛细血管内皮细胞、多个肾细胞及/或多个心肌细胞中的多个糖脂(例如:球形三酰神经酰胺)的多个异常积聚。所述物质的所述多种沉积物可导致严重的神经性疼痛(例如:感觉异常及撕裂性疼痛)、严重的肾疾病及心血管疾病及/或中风。所述糖脂积聚可能引起多个严重症状,如通常在患有法布里病的多个个体中观察到的。通常地,在多个男性患者中被观察到多个更严重的症状,但也可以在所述缺陷基因的多个杂合性女性携带者中被观察到。已知该疾病是诊断不足的,特别是在多个女性患者中。受影响的多个个体具有一大大缩短的预期寿命;通常是在生命中大约所述第四及第五个十年间由肾脏、心脏及/或脑血管的多种并发症引起的死亡。

[0085] 本说明书中,关于 α -半乳糖苷酶的所述术语“单体”是指 α -半乳糖苷酶的一单个多肽“次体”,所述多肽可包括非肽的多个取代基(例如:一个或多个糖基部分)。

[0086] 本说明书中,关于 α -半乳糖苷酶的所述术语“天然”包括含有与一天然存在的 α -半乳糖苷酶蛋白质的一氨基酸序列基本上相同(即至少95%同源性、可选地至少95%同源、可选地至少99%同源、可选地至少99%同源及可选地100%同源)的一氨基酸序列的多个蛋白质。一天然 α -半乳糖苷酶可以从一天然的来源中分离的一蛋白质、或一重组产生的蛋白质(例如:衍生自多个人类细胞、多个哺乳动物细胞、多个植物细胞、多个酵母细胞、多个细菌细胞、多个昆虫细胞等)。

[0087] 当用于提及 α -半乳糖苷酶的一四级结构(例如:一 α -半乳糖苷酶二聚体)时,所述

术语“天然的”还包括与一天然发生的蛋白质的四级结构基本相同的一个四级结构。

[0088] 本说明书中,所述短语“天然存在的蛋白质”是指天然存在的一蛋白质(例如:在生物体中)的一种形式,关于所述蛋白质的氨基酸序列,以及若所述蛋白质是在一稳定的、同型二聚体的形式,则为所述蛋白质的四级结构。

[0089] 天然存在的 α -半乳糖苷酶多个蛋白质(例如:在表达所述天然存在的 α -半乳糖苷酶蛋白质的一生物体中)的多个转译后修饰(例如:糖基化)可以是在本说明书提及的 α -半乳糖苷酶的所述天然形式中存在、不存在或被修饰的。 α -半乳糖苷酶的一天然形式(例如:一重组产生的 α -半乳糖苷酶)可以是可选地包括与所述天然存在的 α -半乳糖苷酶不同的多个转译后修饰,条件是所述天然形式的所述 α -半乳糖苷酶保留了如上所述的作为所述天然存在 α -半乳糖苷酶的一基本上相似的氨基酸序列及结构。

[0090] 本说明书中,一蛋白质的所述天然形式可以指一单体结构(例如:一 α -半乳糖苷酶单体)及/或一多聚体结构(例如:一 α -半乳糖苷酶二聚体)。例如:一个二聚体蛋白质可以被描述为 α -半乳糖苷酶的一天然形式,而一个二聚体蛋白质中的一单体多肽可以被描述为所述 α -半乳糖苷酶单体的一天然形式。

[0091] 可选地,本说明书所述的多聚体蛋白质结构为一个二聚体结构,如同 α -半乳糖苷酶的所述天然形式。

[0092] 替代地,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶包括两种以上的 α -半乳糖苷酶单体。例如:多聚体蛋白质结构可以是一个四聚体、一个六聚体或一个由 α -半乳糖苷酶单体组成的八聚体。

[0093] 本说明书所述的所述发明中的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶包括多个共价键,所述多个共价键连接所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶中的所述多个 α -半乳糖苷酶单体,并且所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶不含所述 α -半乳糖苷酶的所述天然形式。

[0094] 因此,例如:所述连接部分是可选地与一侧链、一N末端或一C末端共价连接的一个部分,或与一 α -半乳糖苷酶单体的多个转译后修饰(例如:一糖类部分)相关的一个部分,以及与一侧链、一N末端或一C末端、或与另一种 α -半乳糖苷酶单体的多个转译后修饰(例如:一糖类部分)相关的部分。示例性的所述多个连接部分在下文中被详细描述。

[0095] 可选地,所述连接部分不含二硫键。然而,在多个单体之间的不形成一连接的一位置包括一个二硫键的一连接部分(例如:所述二硫键的裂解不会裂解所述多个单体之间的所述连接)落入本发明的所述实施例的所述范围内。不含有一个二硫键的连接部分的一潜在优点是所述连接部分不会如二硫键般容易被多个轻度还原条件裂解。

[0096] 所述连接部分在本说明书中也称为一交联部分,通过一连接部分对多个 α -半乳糖苷酶单体进行的连接在本说明书中称为“交联”。

[0097] 在一些实施例中,多个相对短的连接部分在多个不同的 α -半乳糖苷酶单体之间的交联处可以不及多个较长的连接部分有效。

[0098] 因此,根据一些实施例,所述连接部分不是一个共价键、一个化学原子或基团,而是一个桥连部分。

[0099] 因此,根据一些实施例,所述连接部分为至少10个原子的长度、可选地至少20个原子的长度、可选地至少30个原子的长度、可选地至少50个原子的长度、可选地至少100个原

子的长度、可选地至少200个原子的长度、可选地至少300个原子的长度、可选地至少400个原子的长度、可选地至少500个原子的长度、可选地至少600个原子的长度、可选地至少700个原子的长度、可选地至少800个原子的长度并且可选地至少1000个原子的长度。在一些实施例中,所述连接部分的所述长度(以原子数为单位)是在10至1000个原子、15至800个原子、20至600个原子、50至500个原子、65至400个原子、75至350个原子及80至200个原子的范围内。在多个具体的实施例中,所述连接部分的所述长度(以原子数为单位)是20至600个原子。在另一具体的实施例中,所述连接部分的所述长度(以原子数为单位)为140个原子。

[0100] 本说明书中,一连接部分的所述长度(当以原子数来表示时)是指所述连接部分的所述主链的长度,即在通过所述连接部分连接的两个单体中的每一个的多个残基之间形成一直链的原子的数目。

[0101] 根据本发明的一些方面,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的多个单体通过一聚(亚烷基)二醇连接部分彼此共价连接,例如:聚(亚烷基)二醇连接部分,即在一些实施例中,所述连接部分包括一聚(亚烷基二醇)链。

[0102] 本说明书所使用的所述短语“聚(亚烷基二醇)”涵盖一聚醚聚合物家族,所述聚醚聚合物家族具有以下通用分子式: $-O-[(CH_2)_m-O]_n-$,其中 m 代表存在于每个亚烷基二醇单元中的多个亚甲基的数目,而 n 表示所述多个重复单元的数目,因此,代表所述聚合物的所述大小或长度。例如:当 $m=2$ 时,所述聚合物被称为聚乙二醇,当 $m=3$ 时,所述聚合物被称为聚丙二醇。

[0103] 在一些实施例中, m 是大于1的一整数(例如: $m=2,3,4$ 等)。

[0104] 可选地, m 在所述聚(亚烷基二醇)链的所述多个单元之间变化。例如:一聚(亚烷基二醇)链可包括连接在一起的乙二醇($m=2$)单元及丙二醇($m=3$)单元。

[0105] 所述聚(亚烷基二醇)可选地包括至少两个官能团(例如:如本说明书所述),每个官能团与所述多个 α -半乳糖苷酶单体中的一个形成一共价键。所述多个官能团可选地为所述聚(亚烷基二醇)的多个末端基团,使得所述聚(亚烷基二醇)的所述整个长度位于所述两个官能团之间。

[0106] 所述短语“聚(亚烷基二醇)”还含有其类似物,其中所述氧原子被另一个杂原子取代,例如: S 、 $-NH-$ 等。所述术语还涵盖上述多个衍生物,其中包括所述聚合物的一个或多个所述亚甲基被取代。所述多个亚甲基上的多个示例性取代基包含但不限于:烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氧基、羟基、氧代、硫醇及硫代烷氧基等。

[0107] 如本说明书所用,所述短语“亚烷基二醇单元”涵盖如上所述的一 $-(CH_2)_m-O-$ 基团或其类似物,所述亚烷基二醇单元形成所述聚(亚烷基二醇)的所述主链,其中所述 $(CH_2)_m$ (或其类似物)结合到属于另一个亚烷基二醇单元的一杂原子或一 α -半乳糖苷酶单体部分(在一末端单元的情况下),并且所述氧原子(O)(或其杂原子类似物)结合到另一种亚烷基二醇单元的 $(CH_2)_m$ (或其类似物)、或结合到与一 α -半乳糖苷酶单体形成一键结的一官能团。

[0108] 一个亚烷基二醇单元可以是支化的,使得所述亚烷基二醇单元与3个或更多个相邻的亚烷基二醇单元连接,其中所述3个或更多个相邻的亚烷基二醇单元中的每一个为一个聚(亚烷基二醇)链的一部分。所述一个支化的亚烷基二醇单元通过所述杂原子与一相邻的亚烷基二醇单元连接,所述剩余的多个相邻亚烷基二醇单元的多个杂原子各自与所述支化的亚烷基二醇单元的一碳原子连接。另外,一杂原子(例如:氮)可以与一个亚烷基二醇单

元的一部份的多于一个碳原子结合,从而形成一支化的亚烷基二醇单元(例如:[$(-\text{CH}_2)_m$]₂N-等。)

[0109] 在多个示例性实施例中,至少50%的亚烷基二醇单元是相同的,例如:所述多个亚烷基二醇单元由所述相同的杂原子及所述彼此多个相同的m值组成。可选地,至少70%、可选地至少90%、及可选地100%的所述多个亚烷基二醇单元是相同的。在多个示例性实施例中,与所述多个相同的多个亚烷基二醇单元结合的所述多个杂原子为多个氧原子。在进一步的多个示例性实施例中,对于多个相同的单元,m为2。

[0110] 在一个实施例中,所述连接体为一单链直链连接体,例如:聚乙二醇(PEG)。

[0111] 如本说明书所用,所述术语“聚(乙二醇)”描述如上文所定义的一聚(亚烷基二醇),其中至少50%、至少70%、至少90%及优选地100%的所述多个亚烷基二醇单元为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ 。类似地,所述短语“多个乙二醇单元”在本说明书中定义为多个 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ 单元。

[0112] 根据多个可选的实施例,所述连接部分包括一聚(乙二醇)或其类似物,并具有一通式:

[0113] $-\text{X}_1-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_n-\text{X}_2-$

[0114] 其中X₁及X₂各自是一官能团,所述官能团与至少一个α-半乳糖苷酶单体形成一共价键(例如:如本说明书所述);

[0115] Y是O、S或NR₅(可选地为O);

[0116] n是一整数,可选自于1至200(可选地5至150及可选地40至70),尽管也可以考虑多个更高的n值;及

[0117] R₁、R₂、R₃、R₄及R₅中的每一个是独立地选自于由氢、烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氧基、羟基、氧代、硫醇及硫代烷氧基所组成的群组中。

[0118] 在一些实施例中,n为至少5、可选地至少8、可选地至少15、可选地至少25及可选地至少40。

[0119] 在一些实施例中,n不大于200、可选地不大于150及可选地不大于70。

[0120] 所述聚(乙二醇)或其类似物可以可选地由一共聚物组成,例如:其中所述在上式中的所述多个CR₁R₂-CR₃R₄-Y单元彼此不完全相同。

[0121] 在一些实施例中,至少50%的CR₁R₂-CR₃R₄-Y单元是相同的。可选地,至少70%、可选地至少90%,及可选地100%的CR₁R₂-CR₃R₄-Y单元是相同的。

[0122] 可选地,所述连接部分是支化的,例如:对于以上的所述通式中的所述多个CR₁R₂-CR₃R₄-Y单元的一个或多个,R₁、R₂、R₃、R₄及R₅中的至少一个是 $-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_p-\text{X}_3-$,其中R₁至R₄及Y如上文所定义,p是如本说明书对于n所定义的一整数(例如:1至200),并且X₃是如本说明书对于X₁及X₂所定义。

[0123] 所述多个官能团可以可选地形成一键结,例如但不限于:一酰胺键、一胺键、一酯键及/或一醚键

[0124] 例如:所述官能团可以可选地由一羰基组成,所述羰基与一多肽(例如:在一赖氨酸残基或N末端)中的一氮原子中形成一酰胺键、或与一多肽(例如:一丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基)中的一氧原子形成一酯键。

[0125] 替代地或额外地,所述官能团可以可选地包括一杂原子(例如:N、S、O),所述杂原子与一多肽(例如:在一谷氨酸或天冬氨酸残基中或在一个C末端)中的一羰基形成一酰胺

键、一酯键或一硫酯键。

[0126] 替代地或额外地,所述官能团可以包括与一多肽连接(例如:与所述多肽中的一杂原子连接)的一个烷基或芳基。

[0127] 替代地或额外地,所述官能团可以可选地包括与一 α -半乳糖苷酶单体中的一烷基形成一胺键的一氮原子、或一 α -半乳糖苷酶单体可以可选地包括在所述官能团中与一烷基形成一胺键的一氮原子。所述胺键可以通过还原胺化作用形成(例如:如下所述)。

[0128] 在一些实施例中,所述多个官能团的至少一个与一多肽(例如:与其中的一赖氨酸残基)形成一酰胺键。

[0129] 所述多个官能团可以彼此相同或不同。

[0130] 在一些实施例中,所述多个官能团的至少一个与一多肽(例如:一个赖氨酸残基或N末端的一胺基)的一个官能团连接,并且所述多个官能团中的至少一个与一多肽(例如:一半胱氨酸残基的一硫醇基团)的一不同的官能团连接。

[0131] 在一些实施例中,所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以含有多个额外的PEG部分,所述多个额外的PEG部分通过与一单一次体中的一赖氨酸残基结合而仅与所述次体结合。

[0132] 在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅。适用于本发明的所述植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅的所述产生及特征详细描述在本受让人的PCT申请W02011/107990中。本说明书所述的稳定化共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅在本说明书中也称为佩冈尼半乳糖苷酶 α (pegunigalsidase alfa)。

[0133] 本说明书所述的稳定化共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅为具有一生物活性、具有 α -半乳糖苷酶活性。本说明书所述的 α -半乳糖苷酶活性是 α -半乳糖苷酶的特征的一生物活性(例如: α -半乳糖苷酶的一催化活性特征,例如:一基质的一末端 α -半乳糖基部分的水解)。

[0134] 在一些实施例中, α -半乳糖苷酶的一催化活性的特征在于饱和时的一催化速率(即一 $V_{\text{最大值}}$)。

[0135] 替代地,所述 α -半乳糖苷酶活性为一治疗活性(例如:具有一治疗效果的一酶活性),例如:在法布里病的所述背景下的一治疗活性。可选地,在多个实验动物(例如:法布里小鼠)中和可选地在多个人类法布里患者中测定所述治疗活性。

[0136] 确定 α -半乳糖苷酶的一活性的多个技术是本领域技术人员已知的。通常地,将所述 α -半乳糖苷酶(即本说明书所述的天然形式或一多聚体蛋白质结构)与本领域中公认的 α -半乳糖苷酶的一基质的一化合物接触,然后定量测定所述活性程度。允许特别方便地检测 α -半乳糖苷酶活性的多个化合物是本领域已知的并且是可商业上获得的。

[0137] 在一些实施例中, α -半乳糖苷酶活性是通过测定4-甲基伞形基- α -D-吡喃半乳糖苷的水解来决定。在其他实施例中, α -半乳糖苷酶活性是通过测定对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷的水解来决定。

[0138] 当比较本说明书所述的一稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白的一活性与天然的 α -半乳糖苷酶的一活性时,在一些具体的实施例中,所述天然的 α -半乳糖苷酶优选地包括多个 α -半乳糖苷酶单体(例如:相对于氨基酸序列及糖基化模式)与所述稳定化共价

连接的重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白的所述多个 α -半乳糖苷酶单体基本是相同的。

[0139] 根据一些实施例,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的特征在于一人类对象的一生理系统中的一循环半衰期高于非交联 α -半乳糖苷酶[例如:阿加糖酶 α (利甫盖素(**Replagal®**),夏尔)及阿加糖酶 β (法布瑞酶(**Fabrazyme®**),健赞)]的一循环半衰期(例如:至少20%、至少高于50%、至少高于100%、至少高于400%、至少高于900%、至少高于1500%、至少高于2000%、至少高于2500%、至少高于3000%、至少高于3500%、至少高于4000%、至少高于5000%、至少高于7500%、至少高于8000%、高达10,000%、高达20,000%、高达50,000%、高达100,000%、高达200,000%或更高)。

[0140] 如本说明书所述,当在所述临床背景下测试时,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述循环半衰期在静脉输注后显着地延长。因此,根据本发明的一些方面,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在静脉输注后具有至少5小时、至少10小时、至少20小时、至少50、至少60、至少70、至少80或至少90小时的一循环半衰期($T_{1/2}$)。

[0141] 在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述循环半衰期使得本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在静脉内给药后14天的所述血浆浓度为2毫克/公斤体重,与输注后2小时1毫克/公斤体重的商业上可取得的重组人类 α -半乳糖苷酶(阿加糖酶 β ,法布瑞酶)的所述最大血浆浓度具有相同的数量级。

[0142] 在一些实施例中,当静脉内给药于一对象时,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述循环半衰期($T_{1/2}$) 在静脉输注后为至少5、10、20、30、40、至少50、至少60、至少70、至少80或至少90小时。在一些实施例中,静脉输注后的本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶后的所述循环半衰期($T_{1/2}$) 在3至100小时的范围内、在5至70小时的范围内,在5至50、10至45、15至40、20至35、40至69、60至80、60至90及25至50小时的范围内。在多个特定的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述循环半衰期($T_{1/2}$) 为5至10小时、10至20小时、20至50小时、或50至80、或50到90个小时之间。

[0143] 在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述生物利用度可以反映给药后的总有效酶,表示为“曲线下面积”(AUC_{0-∞}),单位为微克*分钟/毫升(ug*min/ml)或纳克*小时/毫升(ng*min/ml)。因此,在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在向一对象以1.0毫克/公斤的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行静脉内给药后的生物利用度(曲线下面积)在10,000至500,000纳克*小时/毫升、50,000至250,000纳克*小时/毫升、至少10,000纳克*小时/毫升、至少25,000纳克*小时/毫升、至少50,000纳克*小时/毫升、至少75,000纳克*小时/毫升、至少100,000纳克*小时/毫升或至少200,000纳克*小时/毫升的范围内。在多个具体的实施例中,在以1.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药后,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述生物利用度(曲线下面积)为100,000纳克*小时/毫升。

[0144] 在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在向一对象静脉内以2.0毫克/公斤的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药后的所述生物利用度(曲线下面积)在以下范围内:50,000至800,000纳克*小时/毫升、100,000至600,000纳克*小时/毫升、150,000至500,000纳克*小时/毫升、至少50,000纳克*小时/毫升、至

少75,000纳克*小时/毫升、至少100,000纳克*小时/毫升、至少200,000纳克*小时/毫升、至少300,000纳克*小时/毫升、至少400,000纳克*小时/毫升或至少600,000纳克*小时/毫升。在多个具体的实施例中,在以2.0毫克/公斤的所述重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药后,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述生物利用度(曲线下面积)为400,000纳克*小时/毫升。

[0145] 一增加的循环半衰期可以可选地与一较高的体内稳定性(例如:对代谢的抗性)、较高的摄取及/或在多个靶器官处的活性相关。

[0146] 多个循环半衰期可以通过以多个不同的间隔从多个生理系统(例如:多个人类、多个实验室动物)中采集多个样品(例如:多个血液样品),并使用本领域已知的多个技术测定所述样品中 α -半乳糖苷酶的一水平来确定。

[0147] 多个组织半衰期可以通过以多个不同的间隔从多个生理系统(例如:多个人类、多个实验室动物)采集多个样品(例如:多个组织样品),并使用本领域已知的多个技术测定所述样品中 α -半乳糖苷酶的一水平来确定。

[0148] 可选地,所述半衰期被计算为一终末半衰期(例如:如下所述多个示例部分),其中半衰期是在达到假平衡分布之后浓度(例如:一血液浓度)降低50%所需的时间。通过时间对于对数(log)浓度的线性回归,可以从一时间对对数浓度的一末端线性部分计算所述终末半衰期(参见例如:Toutain及Bousquet-Melou[兽医药理学与治疗学杂志,2004年,27:427至39])。因此,所述终末半衰期是由药物消除率所导致的药物血浆浓度中的所述降低的一测量,而不是由于其他多个原因所导致的降低,并且不一定是所述给药的药物的数量下降一半所需的时间。

[0149] 确定 α -半乳糖苷酶(例如:本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或所述非交联的 α -半乳糖苷酶)的一水平可以包括检测检测 α -半乳糖苷酶的所述物理存在(例如:通过针对 α -半乳糖苷酶的一抗体)及/或检测 α -半乳糖苷酶活性(例如:如本说明书所述)的一水平。

[0150] 在本说明书中,“人类 α -半乳糖苷酶”是指一植物重组 α -半乳糖苷酶,所述植物重组 α -半乳糖苷酶包括一氨基酸序列,所述氨基酸序列与天然存在于多个人类中的一 α -半乳糖苷酶蛋白的一氨基酸序列基本相同的(例如:如上所述)。

[0151] 适用于本发明的 α -GAL的多个示例包含但不限于:具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3的一氨基酸序列的 α -GAL。可选地,在多个具体的实施例中,所述 α -GAL具有选自SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3的一氨基酸序列。在一些实施例中,所述 α -GAL可以是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中的任一个。在其他多个实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶包括植物重组 α -半乳糖苷酶的一群体,所述群体包括多个植物重组 α -半乳糖苷酶蛋白的一组合,所述多个植物重组 α -半乳糖苷酶蛋白包括SEQ ID NO:2的 α -GAL及SEQ ID NO:3的 α -GAL。

[0152] 如本说明书所用,“ α -半乳糖苷酶”是指对Gb₃(例如: α -半乳糖苷酶A)中的多个半乳糖部分表现出一酶活性(例如:水解)的任何蛋白质。可选地,“ α -半乳糖苷酶”是指E.C.3.2.1.22。如本说明书所用,“酸性 α -半乳糖苷酶”是指 α -半乳糖苷酶,其特征在于在多个酸性pH条件(例如:约pH4.2至5)下从含多个具有半乳糖的寡糖中水解多个末端连接的 α -半乳糖部分的一能力,例如发生的在一溶酶体中。

[0153] 可选地,所述 α -半乳糖苷酶蛋白质还包括至少一个甘露糖-6-磷酸(M6P)部分(M6P)部分,所述M6P部份(或多个部分)可能与所述多个 α -半乳糖苷酶蛋白的所述多个 α -半乳糖苷酶单体中的一个或多个连接(例如:通过一连接体)。

[0154] 用于将多个含有M6P的部分引入到一生物分子(例如:一多肽)的多个技术及多个试剂描述于W02009/024977中。

[0155] 如本说明书详述的,以本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行静脉内给药导致改善/稳定多个人类患者中的多个临床参数,包括:肾脏、心脏及患者(例如:疼痛)评分。

[0156] Gb3糖脂的累积是法布里病的所述自然史的特征,并且其累积的减少是多个法布里患者在ERT的一临床参数。在一实施例中,本发明的所述方法可用于减少糖脂积聚。因此,在一些实施例中,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行静脉内给药降低了血浆Gb3浓度及/或溶酶体-Gb3浓度。在一些实施例中,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的静脉内给药减少了多个对象的多个肾管周毛细血管中的Gb3(糖脂)。在多个具体的实施例中,根据BLISS定量评分,所述降低为至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。在一些实施例中,在所述BLISS评分中测量到减少。在治疗1个月、2个月、3个月、5个月、6个月、1年或更长时间后测量响应于本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶Gb3及/或溶血Gb3的减少。在一些实施例中,与治疗前Gb3相比,当在治疗开始后6个月进行测量时,Gb3的降低为至少50%。

[0157] 多个法布里患者同样患有疼痛,特别是神经性疼痛,并且本发明的方法及稳定化的共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可用于减轻多个患者中的与法布里相关的疼痛。根据一些实施例,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药减轻了所述多个对象的疼痛,许多疼痛问卷可用于评估疼痛减轻,一非限制性列表包括:McGill疼痛问卷、法布里疼痛问卷及简易疼痛量表。在一些实施例中,根据所述简易疼痛量表测量所述疼痛减少。在一些实施例中,根据所述问卷的所述疼痛减少为至少30%、至少40%、至少50%或更多。在多个具体的实施例中,在疼痛上的所述减少为至少减少50%。在治疗1个月、2个月、3个月、5个月、6个月、1年或更长的时间后测量响应于以根据本发明的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药的疼痛减少。在其他实施例中,在治疗开始后6个月测量及/或与多个治疗前评分比较在多个疼痛参数中的所述减少。

[0158] 在一些实施例中,测量在每一治疗周期内1周、2周及3周中的疼痛的所述减少。在一些实施例中,在给药后的所述第二周侦测所述疼痛减少。在一些实施例中,在给药后的所述第三周侦测疼痛上的所述减少。

[0159] 根据其他实施例,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药提供了对所述多个对象的一般生活质量的感知中的改善。许多“生活质量”问卷可用于评估治疗结果,一非限制性列表包括:McGill生活质量问卷、生活质量量表(QOLS)、WHO生活质量(WHOQOL)及EQ-5D-5L问卷。在一些实施例中,根据所述EQ-5D-5L问卷测量生活质量,所述问卷包括5个健康维度:活动性、自我护理能力、进行多个常规活动的 ability、疼痛及不适、以及焦虑及抑郁。每个范畴下有5个选择级别。在一些实施例中,根据所述问卷调查的所述改善为至少30%、至少40%、至少50%或更多。在多个具体的实施例中,生

活质量中的所述改善至少提高50%。在治疗1个月、2个月、3个月、5个月、6个月、1年或更长时间后测量响应于以本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药的生活质量的改善。在其他实施例中,在治疗开始后6个月测量及/或与多个治疗前评分比较生活质量的所述改善。

[0160] 肾损伤是法布里病的另一种常见临床并发症,主要由多个肾小管中糖脂的积聚引起,并且特征在于在所述疾病的过程中发生进行性恶化并导致末期肾病。本发明的所述方法及稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可用于减缓所述肾病的所述进展及肾功能的接近稳定化、或在一患者中维持一稳定的肾功能水平。因此,根据一些实施例,使用本发明的所述多个方法以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药,减弱了在所述多个对象中的法布里肾病。

[0161] 因此,根据其他实施例,使用本发明的所述多个方法以治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药,在所述多个对象中维持一稳定水平的肾脏肾功能。

[0162] 评估多个法布里患者的肾功能的多个方法包括但不限于多个实验室标志物(蛋白尿、微量白蛋白尿、慢性肾病(CKD)评估等)、肉眼可见的血尿、活组织检查、活检、电子显微镜活检、肾功能受损及肾脏超声检查及多个MRI异常。在一些实施例中,根据肾小球滤过率及/或蛋白尿评分测量肾功能(及受损的肾功能或肾病)。肾小球滤过率(GFR)为每单位时间从所述肾(肾脏)肾小球毛细血管过滤到所述肾小囊中的所述液体体积。有几种不同的技术用于计算或估计所述肾小球滤过率(GFR或eGFR)。在临床实践中,肌酐清除率或基于所述血清肌酐水平的肌酐清除率的估计值被用于估计肾小球滤过率。估计GFR(eGFR)的多个最常用的方法为使用肾病饮食改进(MDRD)公式(使用四个变量:血清肌酐、年龄、种族及性别)及CKD-EPI公式(慢性肾病流行病学协会),旨在创造一个比所述MDRD公式更准确的公式。

[0163] 在一些实施例中,具有肾功能恶化的一减弱。在治疗3个月、6个月、12个月、24个月或更长时间后,测量响应于静脉内给药根据本发明的一些方面的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的肾功能恶化的减弱。在其他实施例中,在治疗开始后6个月测量及/或与多个治疗前评分比较与法布里相关的肾衰退的所述减弱。在多个具体的实施例中,所述肾功能维持在一稳定的水平,与当治疗开始时相同或相似,如使用在治疗6个月、12个月、24个月或更长时间后估计的肾小球滤过率及/或蛋白尿评分所测量的。

[0164] 在一些实施例中,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药,改善了所述多个对象中的至少一胃肠道参数。在一些实施例中,所述胃肠道参数包括但不限于:腹痛及/或腹痛的频率。在一些实施例中,具有与GI相关的多个体征及多个症状的所述频率的一减弱。在其他实施例中,在治疗开始后6个月测量及/或与治疗前状态比较在多个胃肠参数中的减少。

[0165] 在多个具体的实施例中,所述与法布里相关的多个胃肠道参数保持在一相似的稳定水平,如在治疗后2个月、4个月、6个月、12个月或更长时间所测量的。

[0166] 在一些实施例中,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药,改善/稳定所述多个对象中的至少一心脏参数。多个心脏参数包括但不限于:多个ECG组分、心脏功能(例如:射血分数)、心律失常、瓣膜功能不全及心脏肥大。在其他

实施例中,多个心脏参数是通过MRI测量的左心室重量(LVM)及左心室重量指数(LVMI)。在治疗6个月、12个月、24个月或更长一段时间后,测量响应于静脉内给药根据本发明的一些方面的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个心脏参数中的改善/稳定性。在其他实施例中,通过MRI在治疗开始后6个月测量及/或与治疗前值比较LVM或LVMI中的所述减少。

[0167] 在多个具体的实施例中,在治疗开始后,治疗6个月,12个月,24个月或更长一段时间后,所述多个心脏参数保持在一稳定水平。

[0168] 在其他实施例中,可以通过所述美因茨严重性评分指数(MSSI)评估一患者的法布里病的所述状态,所述指数是一种用于量化所述法布里疾病负担、所述疾病的多个组合的体征及症状的工具。因此,所述美因茨严重性评分指数可用于评估以所述 α -半乳糖苷酶蛋白质及本发明的多种方法来治疗的多个患者中的疾病状态。因此,根据一些实施例,以所述治疗有效量的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药,在多个对象中维持一稳定或改善的美因茨严重性评分指数评分。根据本发明的一些方面,响应于以本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶进行给药的美因茨严重性评分指数评分可以在治疗6个月、12个月、24个月或更长一段时间后测量。在其他实施例中,在治疗开始后6个月测量及/或与多个治疗前评分比较在美因茨严重性评分指数中的减少。

[0169] 在其他具体实施例中,以美因茨严重性评分指数测量的一患者的法布里病的所述状态保持在一稳定水平,如治疗开始时、治疗后6个月、12个月、24个月或更长一段时间后测量的。

[0170] 根据本发明的多个实施例的另一方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括:如本说明书所述的本发明的一稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶及一药学上可接受的载体。在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶包括:一稳定化共价连接的植物重组人类 α -半乳糖苷酶蛋白。

[0171] 如本说明书所用,一“药物组合物”是指本说明书所述的本发明的一种或多种所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白质与其他化学组分,例如:多个药学上可接受的及合适的载体及赋形剂。一药物组合物的所述目的为促进向一生物体以一化合物进行给药。

[0172] 在下文中,术语“药学上可接受的载体”是指不会对一生物体造成显着刺激并且不会消除所述给药的化合物的所述生物活性及多个性质的一载体或一稀释剂。多个载体的多个示例包括但不限于:丙二醇、盐水、乳液及有机溶剂与水的多个混合物、以及固体(例如:粉末)及气体载体。

[0173] 在本说明书中,术语“赋形剂”是指一种添加到一药物组合物中以进一步促进一活性成分的给药的惰性物质,多个赋形剂的多个示例包括但不限于:碳酸钙、磷酸钙、各种糖和淀粉类型、纤维素衍生物、明胶、植物油以及聚乙二醇。

[0174] 所述药物组合物可选地包括:一额外的成分,所述额外的成分进一步稳定化本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶中的 α -半乳糖苷酶。可选地,所述额外的成分为半乳糖。

[0175] 替代地,一半乳糖衍生物(例如:含半乳糖的糖苷)可被用来代替半乳糖。可选地,使用一非还原性半乳糖衍生物。

[0176] 用于配制和施用药物的技术可以在最新版的“雷明顿制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”,麦克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚

州中找到,其通过引用完全并入本说明书中。

[0177] 本发明的多个药物组合物可以通过本领域的多个熟知的方法来制备,例如:通过常规的混合、溶解、制粒、制糖衣、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法。

[0178] 因此,根据本发明使用的多个药物组合物可以使用一个或多个生理学上可接受的载体以常规方式配制,所述多个载体包括多个赋形剂及多个助剂,所述多个赋形剂及多个助剂有助于将本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶加工成可以在药学上使用的多个制剂,适当的配方取决于所选择的给药途径。

[0179] 对于注射或输注,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以配制在水溶液中,优选在多个生理上相容的缓冲液中,例如:汉克氏溶液(Hanks' s solution)、林格溶液(Ringer' s solution)或生理缓冲盐水,含有或不含有有机溶剂,例如:丙二醇、聚乙二醇。

[0180] 本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以配制成用于静脉内(IV)给药的一含水液体悬浮液或溶液的一部分。

[0181] 本说明书所述的本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以配制为用于肠胃外给药,例如:通过推注或连续输注。多种用于注射或输注的制剂可以以单位剂量调剂存在,例如:在安瓿中或在多个多剂量容器中,可选地,一添加的防腐剂。所述多个组合物可以是油性载体或水性载体中的多个悬浮液、多个溶液或多个乳液,并且可以含有多个配制剂,例如:悬浮剂、稳定剂及/或分散剂。

[0182] 多个用于肠胃外给药的药物组合物包括:水溶形式的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的水溶液。另外,本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液及乳液(例如:油包水、水包油或油包水包油的乳液)。多个合适的亲脂性溶剂或载体包括:脂肪油,例如:芝麻油、或多个合成脂肪酸酯,例如:油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。多个水性注射悬浮液可含有增加所述悬浮液的所述粘度的多个物质,例如:羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。可选地,所述悬浮液还可含有多个合适的稳定剂或试剂,所述多个合适的稳定剂或试剂增加本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述溶解度,以允许制备多个高度浓缩的溶液。

[0183] 本发明的所述多个制剂可以与本说明书所述的多个方法一起使用或与其他用于治疗法布里病的方法一起使用。本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的多个制剂可在向一对对象进行给药之前进一步稀释。在一些实施例中,在向一对对象进行给药之前,以盐水稀释所述多个制剂,并且保持在多个IV袋或多个注射器中。

[0184] 在多个典型的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶按照多个常规方法配制成一种适合于对人类进行静脉内给药的药物组合物。通常地,多个用于静脉内给药的组合物为多个在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,所述药物还可以包括:一增溶剂及一局部麻醉剂,例如:利多卡因,以缓解所述注射部位的疼痛。通常地,所述多个成分单独地供应或以单位剂量调剂混合在一起,例如:作为在例如表示出活性剂的数量的一安瓿或一小药囊的一密封容器中的一干燥的冻干粉末或无水浓缩物。当所述药物通过输注给药时,所述药物可以例如以含有无菌药用级水或盐水的一输注瓶来分配。当所述药物通过注射给药时,可以例如提供一安瓿的无菌注射用水或盐水,以便可以在给药前混合所述多个成分。

[0185] 替代地,本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以是粉末的形式,用于在使用前用一合适的载体(例如:无菌无热原的水)来构建。

[0186] 本说明书所述的药物组合物还可包含:多个合适的凝胶相载体或赋形剂固体,所述多个载体或赋形剂的多个示例包括但不限于:碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶及聚合物,例如:聚乙二醇。

[0187] 适用于本发明上下文的多个药物组合物包括:其中含有一有效量的所述多个活性成分的多个组合物,以达到所述预期目的。更具体地,一治疗有效量是指本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一数量,有效预防、减轻或改善疾病症状、改善生活质量或延长所述被治疗的对象的存活。

[0188] 对于本发明的所述多个方法中使用的任何稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,最初可以从在多个动物上进行的多个活性测定中估计所述治疗有效量或剂量。例如:可以在多个动物模型中配制一剂量,以达到一循环浓度范围,所述循环浓度范围包括通过多个活性测定来确定的 IC_{50} (例如:所述测试稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白的所述浓度,所述浓度在所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白的一生物活性中实现一个半最大增加。)所述多个信息可用于更准确地确定在多个个体中的多个有用剂量。

[0189] 如在以下的所述多个示例部分中所证明的,本发明的多个实施例的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一治疗有效量可以在0.1毫克/千克体重至约5.0毫克/千克体重的范围内。在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一治疗有效量可以是0.1、0.2、0.5、0.75、1.0、1.25、1.50、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.25、3.50、3.75、4.0、4.25、4.50、4.75或5.00毫克/千克体重中的任何一种。在多个具体的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一治疗有效量为1.0毫克/千克体重。在其他具体的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一治疗有效量为2.0毫克/千克体重。在其他具体实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的一治疗有效量为5.0毫克/千克体重。通常,本说明书所描述的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的毒性及治疗功效可以通过在多个实验动物中进行的多个标准药理学方法来测定,例如:通过测定一主体蛋白质结构的 EC_{50} 、 IC_{50} 及 LD_{50} (导致50%的所述多个测试动物中死亡的致死剂量)。从所述多个活性测定及多个动物研究获得的所述数据可用于配制在人类中使用的剂量的一范围。

[0190] 所述剂量可根据所采用的所述剂型及所使用的所述给药途径而变化。所述确切的配方、给药途径及剂量可以由所述个体医生根据所述患者的病情来选择。(参见例如:Fingl等人,1975,“治疗学的药理学基础”,第1章第1页)。

[0191] 可以单独地调整剂量及间隔,以提供足以维持多个所需的效果的所述活性部分的多个血浆水平。在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶通过静脉内输注以20至200毫升/小时(ml/hr)的一速率给药。在多个具体的实施例中,例如:本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以150毫升的总体积以及小于2.0毫克/毫升(mg/ml)的剂量来递送。对于重量低于75公斤的多个患者,多个输注速率可以是37.5或75毫升/小时。对于重量超过75公斤的多个患者为25.2毫升/小时。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以350毫升的总体积以及2.0毫克/千克体重的多个剂量来递送。对于体重小于90的多个患者,多个输注速率可以是58.2毫升/小时。对于体

重超过90公斤的患者,单独测定多个输注速率。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以150毫升的体积来递送,例如:在体重高达70千克的多个患者中,一总体积为250毫升,例如:对于体重在70至100千克之间的多个患者,每次输注一总体积为500毫升,例如:对于体重超过100公斤的多个患者,以0.83毫升/分钟(50毫升/小时)的多个速率进行150毫升的输注、对于250毫升的输注为1.38毫升/分钟(82.2毫升/小时)、及对于500毫升的输注为2.78毫升/分钟(167毫升/小时)。

[0192] 在观察所述多个患者对所述多个治疗的耐受性之后,可以改变多个输注时间。在一些实施例中,基于给药医师的评估,所述输注时间可逐渐减少至1.5小时。

[0193] 在一些实施例中,从开始直至完成本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述需要的剂量的输注时间可长达8小时。在一些实施例中,输注时间为1、2、3、4.5、5、6、7或8小时。在一些情况下,根据多个个体对象的多个个人情况及多个需要,输注时间可超过8小时。

[0194] 在一些实施例中,(例如:当本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶的所述剂量为2.0毫克/千克时),在所述输注开始前12小时及/或2小时,多个静脉内输注可以与一预先给药方案一起给药,包括但不限于:一H1阻滞剂(苯海拉明、羟嗪、西替利嗪、氯雷他定、地氯雷他定)及多个标准剂量的一H2阻滞剂(雷尼替丁、西米替丁、法莫替丁)。

[0195] 令人惊讶的是,当向多个法布里患者进行给药时,与在法布里ERT中使用的多个传统的可用的 α -半乳糖苷酶制剂相比,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶表现出优异、延长的生物利用度(参见下文实施例III-V)。因此,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶不仅在给药后的所述展示的2周期间具有延长的生物利用度,而且直至静脉内给药后的第3周及第4周。

[0196] 因此,在多个具体的实施例中,本发明的所述发明中的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以大于两周(14天 \pm 3天)的多个剂量间隔进行静脉内给药,作为一输注。在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以大于两周(14天 \pm 3天)及长达四周(28天 \pm 3天)的多个剂量间隔进行静脉内给药,作为一输注。在一些实施例中,所述间隔可以是15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天(3周)、22天、23天、24天、25天、26天、27天或28天(4周)、29天、30天、31天(一个月)、32天、33天、34天、35天(5周)、36天、37天、38天、39天、41天、42天(6周)、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天(7周)、50天、51天、52天、53天、54天、55天或56天(8周)中的任何一个。在一些实施例中,本发明的所述发明中的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以大于两周(14天 \pm 3天)及长达八周(56天 \pm 3天)的多个剂量间隔进行静脉内给药,作为一输注。在一些实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以17天至8周、17天至6周、17天至5周、3周至6周、3周至5周、3周至4周、4周至6周或4周至5周的多个剂量进行间隔静脉内给药,作为一输注。在多个具体的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以每6周 \pm 3天一次的多个间隔进行静脉内给药。在其他实施例中,所述间隔为每6周一次。在多个具体的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以每5周 \pm 3天一次的多个间隔进行静脉内给药。在其他实施例中,所述间隔为每5周一次。在多个具体的实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以每4周 \pm 3天(例如:每月)一次的多个间隔进行静脉内给药。在其他实施例中,所述间隔为每4周一次。在一个实施例中,本发明的所述稳定化

共价连接的人类 α -半乳糖苷酶蛋白在多次给药之间以三周 \pm 3天的多个间隔进行给药。

[0197] 在另一个实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多次给药之间以三周的多个间隔进行给药。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个给药之间以1.0毫克/千克体重的一剂量以三周的多个间隔进行给药。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个给药之间以2.0毫克/千克体重的一剂量以三周的多个间隔进行给药。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个给药之间以1.0毫克/千克体重的一剂量以4周的多个间隔进行给药。在其他实施例中,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶在多个给药之间以2.0毫克/千克体重的一剂量以4周的多个间隔进行给药。

[0198] 为了便于根据本发明的所述方法(例如:方案)给予本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶可以配制成用于静脉内给药的一单位剂量调剂、或作为被配制成用于静脉内给药(输注)的一药物组合物来提供。

[0199] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种单位剂量调剂,所述单位剂量调剂包括:2.0至500毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。应当理解,所述范围旨在以一最小剂量以大于2周及最多4周的多个间隔进行给药、以一最大剂量以大于2周的多个间隔进行给药、以及在10至250千克的体重中以至多4周进行给药。

[0200] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含2.0至500毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0201] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含5.0至470毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0202] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含10.0至450毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0203] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含17.0至425毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0204] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含21.0至400毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0205] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含35.0至370毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0206] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含55.0至340毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0207] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含75.0至300毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0208] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含90.0至270毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0209] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含100.0至225毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0210] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含100.0至200毫克的本发明的稳定化共价

连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0211] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含110.0至190毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0212] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含120.0至175毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0213] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含130.0至150毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0214] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含10.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0215] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含30.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0216] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含50.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0217] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含75.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0218] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含100.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0219] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含125.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0220] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含150.0毫克稳定的交联植物重组人类 α 半乳糖苷酶蛋白,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0221] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含175.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0222] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含200.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0223] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含250.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0224] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含300.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0225] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含350.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0226] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含400.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0227] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含430.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0228] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含480.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0229] 根据一个实施例,所述单位剂量调剂包含500.0毫克的本发明的稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶,所述单位剂量调剂被配制为用于向一人类对象给药。

[0230] 根据本发明,在一人类对象中治疗法布里病的所述方法可以作为法布里病的一独立治疗提供,或可以与其他治疗选择、传统治疗或非传统治疗组合。适用于本发明的所述方法或稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶治疗的多个法布里患者也可以在以本发明的所述方法或蛋白质治疗之前、期间或之后接受例如:以多个非ERT治疗剂治疗,例如但不限于:盐酸米加斯他(Migalastat)(伴侣友好治疗公司)、伊比格鲁他(Ibiglustat)(INN)(葡萄糖神经酰胺合成酶(GCS)抑制剂)(健赞公司)、卢格拉斯塔特(Lucerastat)(INN)-哌嗪衍生物(爱可泰隆公司)、NP-003-(α 糖蛋白-1(MDR-1或ABCB 1)抑制剂)(纽拉特士制药公司)、SBLSD-4-(基因治疗(体内基因编辑)-圣加蒙生物科学公司)、Genz-78132(葡萄糖神经酰胺合成酶)(GCS)抑制剂)(健赞公司)、米格鲁斯塔(Miglustat)-(葡糖基神经酰胺合酶(GCS)抑制剂)葛兰素史克公司及爱可泰隆公司)。

[0231] 适合用本发明的所述方法或稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶治疗的多个法布里患者也可以在用本发明的所述方法或稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶治疗之前或之后接受以多个ERT治疗剂及多个方案的治疗,例如但不限于:在所述传统方案中的法布瑞酶(Fabrazyme®)及利甫盖素(Replagal®)或佩冈尼半乳糖苷酶 α 。

[0232] 适合用本发明的所述方法或蛋白质治疗的多个患者群体包括所有年龄的男性及女性的多个法布里患者、具有或不具有多个严重症状的多个法布里患者、多个进展缓慢的患者、多个早期诊断以及具有确定的法布里病患者、多个年轻患者及多个稳定的法布里病患者。

[0233] 如本说明书所用,多个“稳定的”法布里患者是指在一预定时间段内维持所述多个法布里病参数中的至少一个的所述水平及/或在所述参数中维持一相似的恶化速率(例如:心脏、肾脏)[例如:eGFR下降]、疼痛、胃肠道及多个生物标志物[例如:血浆或尿液Gb3及溶酶体-Gb3]等的多个法布里患者。在一些实施例中,多个稳定的法布里患者可包括来自于包括具有多个轻度至中度严重症状的新诊断的多个法布里患者、多个未接受过任何针对法布里病的治疗的患者及多个先前接受法布里病治疗的患者的多个群体中的多个患者。在一些实施例中,所述多个稳定的法布里患者包括在以本发明的所述多个方法及/或多个组合物开始治疗之前是稳定的多个患者。

[0234] 当然地,欲给药的一组合物的所述数量将取决于所治疗的对象、所述痛苦的所述严重程度、所述给药方式、所述处方医师的所述判断等。

[0235] 如果需要,本发明的多个组合物可以存在于一包装或分配器装置中,例如:FDA/EMA(美国食品和药物管理局、欧洲药物管理局)批准的套组,所述套组可以包含一种或多种含有所述活性成分的单位剂量调剂。所述包装可以例如:包括金属或塑料箔,例如但不限于:一泡罩包装或一加压容器。包装或分配器装置可附有多个给药说明。所述包装或分配器还可以附有与所述容器相关联的一注意事项,所述注意事项是以由管理多个药品的制造、使用或销售的一政府机构所规定的一形式,所述注意事项反映由人类的多个组合物的形式或兽医管理的机构所发出的批准。例如:所述注意事项可以是例如由美国食品和药物管理局批准用于多个处方药的标签或一批准的产品说明书。如本说明书所详述,还可以制备本发明的多个实施例的一蛋白质结构,所述蛋白质结构包括在一相容的药物载体中,放置在一合适的容器中,并且被标记用于一指定的病症或诊断的治疗。

[0236] 因此,根据本发明的一实施例,取决于本发明的所述选择的稳定化共价连接的人

类 α -半乳糖苷酶,将本说明书所描述的所述药物组合物包装在一包装材料中,并且在所述包装材料中或所述包装材料上进行印刷,如上所述,有利于用于所述交联蛋白质结构的所述活性在治疗一病症上的用途。

[0237] 在一些实施例中,所述包装材料、包装或分配器、试剂盒或容器可包括或附有向所述有需要的对象以所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或包含其的组合物进行给药。在一些实施例中,多个给药说明可包括在固定在所述多个容器及/或多个小瓶的一标签内,所述多个容器及/或多个小瓶包含本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或多个包含其的组合物。

[0238] 使用说明及给药说明可包括多个具体适应症(例如:法布里病)、用于制备所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或本发明中用于给药的多个组合物的指引,以所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或本发明的多个组合物进行给药及给药后的方案的多个细节,以及关于以所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶或包含其的本发明的多个组合物的所述剂量及方案的多个细节。在多个具体的实施例中,所述多个说明可包括以本发明中的所述发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以大于两周(14天 \pm 3天)、每三周一次、或每4周 \pm 3天一次(例如:每月一次)的多个剂量间隔进行静脉内给药作为一输注的多个指导。在其它实施例中,所述多个说明包括以每4周一次的一剂量间隔进行给药的所述多个指导。在一进一步的实施例中,所述多个说明包括在多次给药之间以本发明的所述稳定化共价连接的人类 α -半乳糖苷酶以三周 \pm 3天的多个间隔进行给药的所述多个说明。

[0239] 如本说明书所用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0240] 术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包括(includes)”、“包含(including)”、“具有(having)”及其词形变化是指“包括但不限于”。

[0241] 所述术语“由...组成(consisting of)”意思是“包括并限于”。

[0242] 词语“示例性”在本说明书中用于指“用作实例、示例或例证”。以“示例性”描述的任何实施方式不必被理解为比其他实施方式优选或有利及/或排除来自其他实施方式的特征的并入。

[0243] 本说明书中所用的词汇“可选择地(optionally)”表示“在一些实施例中提供,而在其它实施例中不提供”。任何本发明的具体的实施例可以包括多个“可选择的”特征,除非此类特征相冲突。

[0244] 本说明书所使用的单数型式“一”、“一个”及“至少一”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如:术语“一化合物”或“至少一种化合物”可以包括多个化合物,包括其混合物。

[0245] 在整个本申请中,本发明的各种实施例可以以一个范围的形式存在。应当理解,以一范围形式的描述仅仅是因为方便及简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制。因此,应当认为所述的范围描述已经具体公开所有可能的子范围以及所述范围内的单一数值。例如:应当认为从1到6的范围描述已经具体公开子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及所数范围内的单一数字,例如1、2、3、4、5及6,此不管范围为何皆适用。

[0246] 每当在本说明书中指出数值范围,是指包括所指范围内的任何引用的数字(分数或整数)。多个短语:第一指示数字及第二指示数字“之间的范围”及第一指示数字“至”第二

指示数字“的范围”在本说明书中可互换,并指包括第一及第二指示数字,及其之间的所有分数及整数。

[0247] 本说明书中所使用的术语“方法”是指用于完成一特定任务的方式(manner)、手段(means)、技术(technique)及程序(procedures),所述给定的任务包括但不限于已知的或是从已知的方式、手段、技术或步骤很容易地由化学、药理、生物、生化及医学领域的从业者开发所述多个方式、手段、技术以及程序。

[0248] 如本说明书所用,术语“治疗”包括终止、基本上抑制、减慢或逆转病症的进程,基本上改善病症的临床或心理症状或基本上预防病症的临床或心理症状的出现。

[0249] 可以理解,本发明中的特定特征,为清楚起见,在分开的实施例的内文中描述,也可以在单一实施例的组合中提供。相反地,本发明中,为简洁起见,在单一实施例的内文中所描述的各种特征,也可以分开地、或者以任何合适的子组合、或者在适用于本发明的任何其他描述的实施例中提供。在各种实施例的内文中所描述的特定特征,并不被认为是那些实施例的必要特征,除非所述实施例没有那些组件的情况下不起作用。

[0250] 如上文描绘及下文权利要求部分所要求的本发明的各种实施例及各个方面可在下文的多个实施例中找到实验支持。

[0251] 多个示例:

[0252] 现在参考以下实施例,连同以上的多个描述一起以一非限制性方式说明本发明的一些实施例。

[0253] 示例1:

[0254] 临床试验方案:一阶段1/2,开放标签,剂量范围研究,以评估佩冈尼半乳糖苷酶 α 的安全性、耐受性、多个药物代谢动力学及多个探索性功效参数。

[0255] 每两周向多个成年法布里患者进行静脉输注给药:

[0256] 所述研究评估了在所述目标群体中与双-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CL45) (佩冈尼半乳糖苷酶 α) 交联的植物重组人类 α -半乳糖苷酶的所述安全性、耐受性、药物代谢动力学及探索性功效。要求多个对象基于具有所述疾病的多个表现的 α -GAL-A活性(男性)或基因测试(雌性)确定法布里病的一确诊,并且在过去6个月内未以ERT治疗。选择作为多个终点的所述多个参数是与所述疾病最相关的所述多个参数,并且允许对多个安全的药物代谢动力学及多个功效终点进行一显着且相关的评估。三个剂量水平的所述研究提供了3个剂量水平关于安全性、耐受性及临床结果的重要信息。

[0257] 研究群体的选择:

[0258] 多个入选标准:

[0259] 1. 有症状的成年法布里患者(>18岁,男性及女性)

[0260] 2. 男性:血浆及/或白细胞 α -半乳糖苷酶活性(通过活性测定)低于正常下限(在血浆中的LLN=3.2纳摩尔浓度/小时/毫升,在多个白细胞中的LLN=32纳摩尔浓度/小时/毫克/蛋白质)

[0261] 3. 女性:多个历史遗传测试结果与多个法布里突变一致

[0262] 4. 在尿液中的球形三酰神经酰胺(Gb3)浓度>正常上限的1.5倍

[0263] 5. 多个过去从未接受酶替代疗法(ERT)的患者、或多个过去6个月未接受过ERT且抗佩冈尼半乳糖苷酶 α 抗体检测呈阴性的患者

- [0264] 6. $\text{eGFR} \geq 60$ 毫升/分钟/1.73平方米
- [0265] 7. 签署知情同意书
- [0266] 8. 多个女性患者及多个男性患者的多个共同伴侣, 具有适育年龄的潜力, 同意使用一医学上可接受的避孕方法, 不包括安全期避孕法
- [0267] 多个排除标准:
- [0268] 将存在以下任何一项的一对象排除在参与之外:
- [0269] 1. 在研究筛选之前的30天内参与一研究药物的任何试验
- [0270] 2. 以法布瑞酶(**Fabrazyme®**) (阿加糖酶 β (agalsidase- β)) 及利甫盖素(**Replagal®**) (阿加糖酶 α (agalsidase- α)) 中任一种或任何其他用于治疗法布里病的研究药物进行治疗
- [0271] 3. 慢性肾病第3至5期 (CKD 3至5)
- [0272] 4. 透析史或肾移植史
- [0273] 5. 血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 治疗在筛选前4周开始或剂量改变
- [0274] 6. 由MRI测得严重心肌纤维化 (>2个延迟增强 [LE] 阳性左心室节段) (Weidemann等人, 2009)
- [0275] 7. 临床中风史
- [0276] 8. 怀孕或哺乳
- [0277] 9. 存在HIV及/或HBsAg及/或多个丙型肝炎感染
- [0278] 10. 已知对ERT过敏
- [0279] 11. 已知对多个钆基造影剂过敏
- [0280] 12. 存在任何医学、情绪、行为或心理状况, 根据所述研究者及/或医学主任的判断, 会干扰所述患者对所述研究的所述多个要求的依从性。
- [0281] 药物给药:
- [0282] 所有输注均在住院期间进行, 并具有输注后观察期, 可根据需要进行门诊监测。
- [0283] 三个治疗组构成所述对象群体。
- [0284] 治疗组I: 每2周0.2毫克/千克, 治疗组II: 每2周1毫克/千克, 治疗组III: 每2周2毫克/千克。
- [0285] 多个对象 (每组4-8名患者) 每2周 (14天) 接受静脉内输注。
- [0286] 多个药物代谢动力学 (PK) 参数:
- [0287] 以下多个PK参数来自于所述血浆浓度对多个时间曲线, 以确定所述研究药物的所述图谱: $C_{\text{最大值}}$ 、 t 、 $T_{\text{最大值}} (T_{\text{max}})$ 、 AUC_{0-t} 及 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 。在治疗第1天 (第一次输注)、3个月 (3M) 访视输注、6个月 (6M) 访视输注及12个月 (12M) 访视输注时取样。在以下多个时间点取出用于PK的血液: 输注前 (基线); 在所述输注开始后1小时; 在所述输注结束时; 在所述输注后的1、4、8、24、48+3、72+3、96+3小时及2周 \pm 3天 (在所述患者进行下一次输注之前抽取最后的血液样品)。
- [0288] (多个) 功效变量:
- [0289] 评估用于多个终点分析的多个功效参数如下:

- [0290] • 在所述研究期间于基线及每次输注时的血浆及尿沉渣中的多个Gb3浓度
- [0291] • 在所述研究期间于基线及每次输注时的血浆中的球形三酰鞘氨醇 (Lyso-Gb3) 浓度
- [0292] • 评估在基线及最后输注时的多个胃肠道症状
- [0293] • 在基线及最后输注时的多个肾功能 (eGFR及蛋白尿)
- [0294] • 在基线及最后输注时的短式短暂疼痛量表 (BPI)。
- [0295] 可选地在基线进行以下多个额外的程序。
- [0296] • 用于Gb3浓度的肾活检
- [0297] • 用于Gb3浓度的皮肤穿刺活检
- [0298] • 所述心脏及大脑的MRI
- [0299] • 美因茨严重程度评分指数 (MSSI)
- [0300] • 心脏功能评估 (心脏超音波图及压力测试)
- [0301] 多个安全变量：
- [0302] 通过由治疗引起的多个不良事件 (AEs) 的所述频率、严重程度及持续时间来评估安全性,包括:临床上显着的实验室异常、基线的ECG变化、多个身体检查结果发现及在以所述研究药物进行给药后的所述注射部位的评估。
- [0303] 在基线、每月、最后一次输注以及最后一次输注后1及3个月进行给药前评估多个抗 (佩冈尼半乳糖苷酶 α) 抗体。
- [0304] 临床实验室评估：
- [0305] 在以双-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CL45, 佩冈尼半乳糖苷酶 α) 交联的植物重组人类 α -半乳糖苷酶进行给药的过程中还评估了以下多个临床参数：
- [0306] • 血液学:全血细胞计数;总白细胞计数与差异 (中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞)、总红细胞 (血红蛋白、血细胞比容、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白及平均红细胞血红蛋白浓度) 及血小板。
- [0307] • 凝血概况:凝血酶原时间 (PT) 及部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)
- [0308] • 生物化学:钠、钾、葡萄糖、血尿素氮、肌酸酐、钙、磷酸盐 (无机)、尿酸、总蛋白、白蛋白、胆红素 (总)、碱性磷酸酶、天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶、乳酸脱氢酶及肌酸磷酸激酶
- [0309] • 尿液分析:试纸用于检测血液、葡萄糖、酮及蛋白质的存在
- [0310] 多个抗佩冈尼半乳糖苷酶 α 抗体：
- [0311] 评估抗佩冈尼半乳糖苷酶 α ,包括多个中和抗体,所述多个中和抗体在具有一阳性IgG抗体应答的多个对象中。
- [0312] 多个不良事件 (AE) 及多个严重不良事件 (SAE)：
- [0313] 一不良事件 (AE) 被定义为参与一临床试验的一对象中的任何不良医学事件,包括与使用佩冈尼半乳糖苷酶 α 暂时相关的任何不利及非预期的体征、症状或疾病,无论是否与所述研究药物相关。多个不良事件是从治疗开始直到最后一次给药后90天中收集。不良事件还包括多个意外伤害、在计划滴定以外的医药 (药物及/或剂量) 的任何变化的多个原因、进入一医院的多个原因或多个外科手术的多个原因 (除非对于一预先存在的病症进行小的选择性手术)。

[0314] 示例II:

[0315] 佩冈尼半乳糖苷酶 α 在减少多个法布里病症状方面是安全且有效:

[0316] 在以0.2毫克/千克、1.0毫克/千克及2.0毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 进行静脉注射治疗后,监测多个患者在多个临床参数上的安全性(多个不良反应)及多个改善。安全性数据表明佩冈尼半乳糖苷酶 α 的耐受性良好,所述多个18名患者具有一较低的不良反应发生率。佩冈尼半乳糖苷酶 α 也有效减少血浆及肾小管周毛细血管球形三酰神经酰胺(Gb3)。

[0317] 在以佩冈尼半乳糖苷酶 α 治疗6个月后,在多个男性患者中也观察到血浆Gb3及lysoGb3的一显著的降低。在以佩冈尼半乳糖苷酶 α 治疗12个月的所有患者中,肾功能(eGFR及尿蛋白/肌酐)保持稳定。因此,每两周给药一次的佩冈尼半乳糖苷酶 α 治疗对于多个法布里患者显然是安全且有效。

[0318] 示例III:

[0319] 佩冈尼半乳糖苷酶 α 的药物代谢动力学特征:

[0320] 交联增强了佩冈尼半乳糖苷酶 α 的生物利用度:

[0321] 基于佩冈尼半乳糖苷酶 α 血浆水平,监测在接受0.2毫克/千克、1.0毫克/千克及2.0毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个患者在治疗的第1天(第一次输注)、3个月(3M)访视静脉内(IV)输注,6个月(6M)访视静脉内(IV)输注及12个月(12M)访视静脉内(IV)输注的多个药物代谢动力学参数。在给药前及多个治疗之间的14天内立即抽取用于PK的血液。

[0322] 对于所有剂量(参见图1中的多个实施例),以一剂量依赖性方式,在给药后的所述整个14天内,(通过使用抗佩冈尼半乳糖苷酶 α 抗体的免疫测定法测量)的所述酶的显著血浆浓度可清楚地检测到。在所有剂量中,所述血浆浓度在给药后很快达到峰值,并且在接下来的14天内表现出一缓慢、稳定的下降。图2显示出给药后的临床批准的商业阿加糖酶 β (r-alphahGalA,哺乳动物细胞重组人类 α -GAL A,法布瑞酶(FabrazymeTM),健赞公司,剑桥,马萨诸塞州)的血浆浓度的一药物代谢动力学图谱。与佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所述药物代谢动力学图谱形成鲜明对比,如所述图示所示,阿加糖酶 β 在给药后10小时内在多个患者的血浆中几乎检测不到。因此,佩冈尼半乳糖苷酶 α 似乎具有一大幅提高的生物利用度,延伸超过本说明书所示的14天,并且明显优于所述临床批准的法布瑞酶(FabrazymeTM)。

[0323] 当评估多个特定的药物代谢动力学变量时,佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所述多个优势变得更加明显。给药后的所述酶的最大血浆浓度($C_{\text{最大值}}$,图3A)及所述总生物利用度(血浆对时间的曲线下面积,延伸至无穷大, $AUC_{0-\infty}$,表示为质量(例如:微克(ug)或纳克(ng))的酶x每毫升血浆的时间(例如:分钟或小时),图3C)为剂量依赖性,并且与图1中所示的所述总药物代谢动力学图谱一致。与阿加糖酶 β 相比,佩冈尼半乳糖苷酶 α 的 $C_{\text{最大值}}$ 及 $AUC_{0-\infty}$ 明显优于商业上可取得的酶。每次剂量的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的半衰期($t_{1/2}$)比临床批准的商业上可取得的阿加糖酶 β (法布瑞酶(FabrazymeTM),健赞公司,剑桥,马萨诸塞州)及阿加糖酶 α (利甫盖素(Replagal®),夏尔人类基因治疗公司(HGT),剑桥,马萨诸塞州,美国)(图3B)。

[0324] 以下的表1示出了佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所述多个药物代谢动力学参数的所述多个详细的数值:

[0325] 表1:佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个药物代谢动力学参数

[0326]

剂量 (n)	平均值 ± 标准误(SE)			
	AUC _{0-∞} (纳克·小时/毫升)	C _{最大值} (纳克/毫升)	C _{2周} (纳克/毫升)	t _{1/2} (小时)
0.2 毫克/千克	70,070 ± 10,632	1,858 ± 217	21.0 ± 10.5	60.3 ± 8.0
1 毫克/千克	390,896 ± 55,716	11,123 ± 984	130 ± 28	78.9 ± 4.2
2 毫克/千克	619,393 ± 79,281	16,625 ± 2,150	193 ± 142	70.7 ± 9.0

[0327] 考虑到佩冈尼半乳糖苷酶α的半衰期(参见图3B),在经过14天时间段后的第14天的所述血浆浓度的外推表明即使在第21天及第28天或更晚,预计多个显著潜在治疗量的pegunigalsidase alfa维持在所述多个患者的血浆中。

[0328] 示例IV:

[0329] 交联的prh-α-GA L-I-CL45的免疫原性及生物利用度:

[0330] 多个血清样品每月抽取一次,持续4个月,然后每2个月抽取一次。分析了144个样品,其中123个对多个抗药物抗体(ADA)呈阴性。多个经确认的阳性样品进一步对中和活性、抗聚糖及抗PEG抗体进行表征。

[0331] 已经报道了抗交联的prh-α-GAL-I-CL45抗体形成一低发生率。三名患者(19%)在至少一次访视中被鉴定为治疗诱导的抗药物抗体呈阳性,所述三名患者中的两名具有多个中和抗体。所述抗药物抗体的存在是短暂的,并且在治疗6至15个月或在所述多个患者中未发现任何抗药物抗体。值得注意的是,经过12个月的治疗,接受2.0毫克/千克的交联的prh-α-GAL-I-CL45的族群中的所述多个患者均未发现形成多个治疗诱导的抗交联的prh-α-GAL-I-CL45抗体。

[0332] 不希望受限于一单一假设,所述多个结果表明交联的prh-α-GAL-I-CL45的多个重复处理,凭借其改善的稳定性而提供连续暴露,可导致诱导免疫耐受性。

[0333] 示例五:

[0334] 交联的佩冈尼半乳糖苷酶α的多个增强的药物代谢动力学及一扩展的剂量方案:多中心开放性标签转换研究

[0335] 多个法布里病患者的传统酶替代疗法要求在多个治疗之间以多个最大间隔为两周(14天)给药所述药物,在不显著减少所述治疗的所述临床效力或增加多个与治疗相关的不良事件的情况下,延长多个治疗之间的间隔,可以具有重大的临床重要性,减少多个干预的所述次数,并且改善患者的依从性。鉴于在接受多个双周输注佩冈尼半乳糖苷酶α的法布里病患者中观察到的所述多个增强的药物代谢动力学,可以评估一延长剂量方案的效果。

[0336] 可根据纳入及排除多个标准对所述研究进行患者选择,所述多个标准包括但不限于:没有严重症状的多个法布里患者的治疗、相对缓慢进展的患者、多个早期诊断的患者、保持多个稳定的疾病症状的多个患者、或在一选定的时间段内保持一类似的恶化率的多个患者。

[0337] 多个示例性研究纳入标准可以是但不限于：具有确认的法布里病的多个患者，如通过例如 α 半乳糖苷酶活性及多个遗传测试来定义，具有根据例如所述患者的eCFR及eGFR斜率而定义的轻度至中度症状，多个患者的年龄为16至65岁，进行ERT至少3年。

[0338] 如示例I中详述的进行临床实验室评估、监测安全性及多个功效变量及多个不良事件以及记录多个药物代谢动力学参数，在多个治疗之间的所述延长的间隔的需要进行改变（例如：在第一次及最后一次输注的以下多个时间点中采集多个样品：输注前（基线）；所述输注开始后1小时；所述输注结束时；输注后1、4、8、24、48+3、72+3、96+3小时、2周±3天及3周+3天（最后的血液样本将在所述患者的所述第二次输注之前抽取）。可选地，还在输注后第2周至第3周之间的所述间隔中采集多个样品，并且进一步可选地，在输注后大于3周的多个时间点，例如：在输注+3天后的4（四）周及/或输注后第3周至第4周之间的所述间隔采集多个样品。

[0339] 接受所述三周或四周剂量的多个患者或输注后大于两周的任何剂量的多个患者中的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个持续治疗血浆水平没有多个显著的副作用，并且维持多个满意或相似水平的多个临床参数，例如：在所述多个患者之前的ERT治疗中，在所述整个治疗期间的多个临床参数可以构成用于以佩冈尼半乳糖苷酶 α 进行法布里病的酶替代疗法的延长剂量方案的一新的及改进的方案的基础。在多个输注之间的多个最佳间隔可以通过所述临床数据及多个药物代谢动力学参数的分析来确定（或估算）。

[0340] 示例六：

[0341] 2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 与1毫克/千克的法布瑞酶(Fabrazyme[®])的投影分析：

[0342] 为了确定当多个给药之间的所述间隔从2周延长至3或4周时的所述可能的多个药物动力学特征，并且将估计的佩冈尼半乳糖苷酶 α 暴露与估计的法布瑞酶暴露进行比较，进行一投影分析。

[0343] 交联的prh- α -GAL-I-CL45（佩冈尼半乳糖苷酶 α ）的动力学：

[0344] 示例1中示出了来自于接受2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α （ $n=4$ ）的多个患者的所述数据，用于佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所述多个投影的所述主要部分。多个投影通常取决于线性剂量比例性。作为所述多个投影的一起点，选定了所述3个月的数据。所述4个对象在3个月中的所述多个半衰期值为70.1至105小时。

[0345] 由于所述佩冈尼半乳糖苷酶 α 的先前剂量在3个月之前存在多个可测量的浓度，因此使用每一对象的所述终末消除率（ λ_z ）值将所述多个给药前浓度外推至每一所述多个采样时间。从所述多个测量的浓度中减去所述多个外推浓度，以得到由于在3个月时所述给药的剂量所导致的多个浓度。使用凤凰温诺林(Phoenix WinNonlin)软件将每一对象的所述调整的3个月数据拟合至一个二室模型。所述多个模型变量的所述多个平均估计值被用来模拟3个2毫克/千克的连续剂量，多个间隔为2、3或4周。所述假设输注时间为6小时。 $C_{\text{最大值}}$ 、 AUC_{τ} （ AUC_{tau} ）（多个剂量之间的所述时间的所述面积）及 $C_{\text{分钟}}$ （ C_{min} ）（所述后续剂量之前的所述浓度）的所述多个数值示出在表2中。

[0346] 表2：预测的药物代谢动力学参数

[0347]

间隔	第一次给药 (2 毫克/千克)			
	C _{最大值} (纳克/毫升)	AUC _τ (纳克·小时/毫升)	C _{平均} * (纳克/毫升)	C _{分钟} ** (纳克/毫升)
q 2 周	22,213	1,108,471	3,299	207
q 3 周	22,213	1,123,108	2,228	25
q 4 周	22,213	1,124,907	1,457	3

[0348] *给药间隔为2、3或4周时的平均浓度。

[0349] **下次给药前最后一次抽样时间的浓度;在所述输注的开始后2、3或4周。

[0350] 法布瑞酶的药物代谢动力学:

[0351] 法布瑞酶的多个药物代谢动力学参数取自于所述包装附页及由Eng等人,2001 (美国人类遗传学杂志,68:711至722)图2的一刊物中。

[0352] 部分AUC及C_{平均}* (C_{ave}*):

[0353] 表3示出了每2周1毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶α及法布瑞酶的各种给药方案后的多个投影药物代谢动力学参数的一比较。

[0354] 从所述正在进行的第I/II期研究中获得了佩冈尼半乳糖苷酶α的数据。关于法布瑞酶的所述多个药物代谢动力学特征的信息可在所述包装附页及Eng等人,2001 (美国人类遗传学杂志,68:711至722)的一刊物中获得。使用凤凰温诺林软件 (版本6.3) 来完成投影模型。

[0355] 所述每周部分AUC计算及C_{平均}计算能够对佩冈尼半乳糖苷酶α的第1、2、3及4周的所述药物有效性进行所述比较评估/估计,并且每两周与法布瑞酶进行比较。

[0356] 所述数据按周计算,并且按顺序显示。多个粗线表示所述重复给药的所述时间。因此,对于所述2周的间隔,第3行、第5行及第7行代表剂量给药,对于第3周的间隔,第4行、第7行及第10行代表剂量给药等)。所述多个灰色及白色方块视觉上定义为不同的输注间隔。在168小时 (1周) 及336小时 (2周) 的所述平均每周的多个酶浓度进行内插或外推,以便按周估计药物覆盖率。如表中所示:对于佩冈尼半乳糖苷酶α,2毫克/千克,每2、3或4周,所述多个每周C_{平均}数值 (分别为709、87及11毫克/毫升) 显着地高于可忽略不计的法布瑞酶的第2周的多个C_{平均}数值。

[0357] 在所述输注后10小时的法布瑞酶的多个C_{平均}水平类似于以2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶α进行给药后的第4周的多个估计的C_{平均}水平,每4周 (11纳克/毫升)。

[0358] 图4A图示了在一单次输注2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶α后在一4周的时间段内的外推的酶有效性 (血浆浓度)。当以佩冈尼半乳糖苷酶α治疗一4周的时间段后的所述投影AUC与每两周给药的法布瑞酶进行比较时,在同一时期中,佩冈尼半乳糖苷酶α的酶有效性的维持明显优于法布瑞酶 (见图4B,特别是插图)。

[0359] 所述多个结果表示与法布瑞酶相比,在3周及4周的输注间隔中以2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶α进行给药后,预计在整个治疗期间中,多个显着水平的酶被保留在循环中

并且可以到达所述多个目标器官。

[0360] 表3:多个部分区域及12周的治疗的C_{平均}

[0361]

	法布瑞酶, 1 毫克/ 千克,		植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG ₄₅ , 2 毫克/kg,					
	q 2 周		q 2 周		q 3 周		q 4 周	
时间 (周)	部分 AUC (周) (纳克·小 时/毫升)	一周 C _{平均} (纳克/毫 升)	部分 AUC (周) (纳克·小 时/毫升)	一周 C _{平均} (纳克/毫 升)	部分 AUC (周) (纳克·小 时/毫升)	一周 C _{平均} (纳克/毫 升)	部分 AUC (周) (纳克·小 时/毫升)	一周 C _{平均} (纳克/毫 升)
1	11,667	69	989,406	5,889	989,406	5,889	989,406	5,889
2	零	零	119,065	709	119,065	709	119,065	709
3	11,667	69	1,004,012	5,976	14,637	87	14,637	87
4	零	零	120,864	719	991,201	5,900	1,799	11
5	11,667	69	1,004,233	5,978	119,286	710	989,627	5,891
6	零	零	120,892	720	14,664	87	119,092	709
7	11,667	69	1,004,233	5,978	991,205	5,900	14,640	87
8	零	零	120,892	720	119,287	710	1,800	11
9	11,667	69	1,004,233	5,978	14,664	87	989,627	5,891
10	零	零	120,892	720	991,205	5,900	119,092	709
11	11,667	69	1,004,233	5,978	119,287	710	14,640	87

[0362]

12	零	零	120,892	720	14,664	87	1,800	11
----	---	---	---------	-----	--------	----	-------	----

[0363] 总之,本说明书提供的所述多个结果表明所述交联的 α -半乳糖苷酶佩冈尼半乳糖苷酶 α 的所述多个药物代谢动力学性质与目前批准的哺乳动物细胞来源的多个法布里ERT的阿加糖酶 β (法布瑞酶 (FabrazymeTM), 健赞公司, 剑桥, 马萨诸塞州) 及阿加糖酶 α (利甫盖

素(**Replagal®**), 夏尔人类基因治疗公司 (HGT), 剑桥, 马萨诸塞州, 美国) 相比是不同且有利的。对于所有剂量的佩冈尼半乳糖苷酶 α 观察到的所述较长的半衰期($t_{1/2}$) 及显着更高的总生物利用度($AUC_{0-\infty}$) 反映了在多个输注(多个给药) 之间的所述整个2周内存在可用的活性酶。所述改进的药物代谢动力学特征表明所述佩冈尼半乳糖苷酶 α 适用于法布里病的有效长期的酶替代疗法, 并且可以以至少2周至每4周的多个间隔进行给药。

[0364] 实施例VII:

[0365] 临床试验方案: 一第3阶段, 开放性标签, 转换研究, 以评估佩冈尼半乳糖苷酶 α 的安全性、功效及药物代谢动力学。每4周向目前正以ERT治疗的多个成人法布里患者进行以静脉输注: 法布瑞酶(**Fabrazyme®**) (阿加糖酶 β) 或利甫盖素(**Replagal®**) (阿加糖酶 α):

[0366] 本研究评估植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CL45) (pegunigalsidase alfa) 在目前正以商业上可取得的ERT (阿加糖酶 α 或阿加糖酶 β) 治疗的多个法布里病患者中的安全性、有效性及药物代谢动力学。多个对象被要求具有基于所述疾病的多个表现的 α -GAL-A活性(男性) 或基因测试(女性) 对法布里病进行一明确的诊断, 并且已经以ERT治疗至少3年。以植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CL45) (pegunigalsidase alfa) 以每四(4) 周2毫克/千克的一剂量进行给药52周。

[0367] 被选定作为多个终点的所述多个参数是与所述疾病最相关的所述多个参数, 并且允许对所述安全性、药物代谢动力学及多个功效终点进行一重要且相关的评估。

[0368] 药物剂量及给药:

[0369] 确认适格性后, 多个患者应每4周转换为静脉注射2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 。佩冈尼半乳糖苷酶 α 的输注时间根据所述待检患者的所述体重而变化: 患者耐受性、研究者评估及赞助医疗监测员/主任的批准以及尝试逐渐减少逐渐使用的前置药物后。

[0370] 多个药物代谢动力学(PK) 参数:

[0371] 以下多个药物代谢动力学参数来自于所述血浆浓度与时间的图谱, 以确定所述研究药物的所述PK曲线: $C_{\text{最大值}}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $T_{\text{最大值}}$ 、 AUC_{0-t} 及 $AUC_{0-\infty}$ - 用于药物代谢动力学分析的血液将在第1天及治疗结束(52周)。在抽取血液的日子, 在以下的多个时间点采集多个血液样本: 输注前(基线); 所述输注的开始后1小时; 在所述输注结束时; 输注后1+0.25、2+0.25、4+0.25、8+0.25、24+0.5、48+3及96+3小时以及输注后14+3、21+3及28+3天(最后的血液样本将在所述患者进行下一次输注之前抽取)(在28天内总共13个时间点)。

[0372] (多个) 功效变量:

[0373] 评估用于分析多个终点的多个功效参数如下:

[0374] 1. 估计肾小球滤过率($eGFR_{CKD-EPI}$)

[0375] 2. 超声心动图检测左心室质量指数(克/平方米)

[0376] 3. 血浆中的球形三酰神经酰胺(Lyso-Gb3) 浓度

[0377] 4. 血浆中的多个Gb3浓度

[0378] 5. 尿液Lyso-Gb3

[0379] 6. 蛋白质/肌酐比率的单次尿液检测

[0380] 7. 使用止痛药的频率

[0381] 8. 运动耐量(压力测试)

[0382] 9.短式短暂疼痛量表 (BPI)

[0383] 10.美因茨严重程度评分指数 (MSSI)

[0384] 11.生活质量EQ-5D-5L

[0385] 多个安全变量:

[0386] 安全性通过以下基线的多个变化进行评估:多个临床实验室测试、身体检查、给药后注射部位的评估、心电图 (ECG)、频率、严重程度及治疗期间的多个紧急不良事件 (AEs)、逐渐减少输注的前置药物的能力、总体上需要使用前置药物来控制输注反应及由治疗诱导的多个抗佩冈尼半乳糖苷酶 α 抗体。

[0387] 先前的多个结果显示,在每两周一次的输注 (给药) 方案中,所有剂量的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的一较长的半衰期 ($t_{1/2}$) 及显着更高的总生物利用度 ($AUC_{0-\infty}$)。多个延长的剂量间隔可对用于法布里病的ERT的方便性、成本、依从性及多个不良反应的频率具有显着的影响。为了评估植物重组人类 α -半乳糖苷酶交联双-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CL45) (pegunigalsidase alfa) 对法布里病的有效长期的酶替代疗法的所述适用性,佩冈尼半乳糖苷酶 α 以每4周一的多个间隔进行给药。

[0388] 在所述开放性标签转换研究中评估每4周一次2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 治疗在多个患者中的安全性、有效性及药物代谢动力学,被招募的所述多个患者先前以ERT (阿加糖酶 α 或阿加糖酶 β) 治疗至少3年且以一稳定的剂量至少最后6个月 ($>80\%$ 标记剂量/千克),并且从他们目前的ERT转换为每4周接受2毫克/千克的佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个静脉内 (IV) 输注52周 (总共14次输注)。

[0389] 在从输注与输注的所述4周的间隔内维持所述交联的 α -半乳糖苷酶佩冈尼半乳糖苷酶 α 的多个增强的药物代谢动力学性质的重要证据将有助于确定所述交联的 α -半乳糖苷酶佩冈尼半乳糖苷酶 α 与其他已批准的相比是不同的且有利的,商业上可取得的多个法布里ERT的阿加糖酶 β (法布瑞酶 (FabrazymeTM), 健赞公司, 剑桥, 马萨诸塞州) 及阿加糖酶 α (利甫盖素 (ReplagalTM), 夏尔人类基因治疗公司 (HGT), 剑桥, 马萨诸塞州, 美国)。

[0390] 虽然本发明结合其具体实施例而被描述,显而易见的是,许多替代、修饰及变化对于那些本领域的技术人员将是显而易见的。因此,其意在涵盖落入所附权利要求书的范围内的所有替代、修饰及变化。

[0391] 在本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请以其整体作为参考文献并入本说明书中,其程度如同各独立的出版物、专利或专利申请案被明确地且个别地标示为以引用的方式并入本说明书中。此外,本申请中任何参考文献的引用或证明不应被解释为承认所述参考文献可作为本发明的现有技术。本申请中标题部分在本说明书中用于使本说明书容易理解,而不应被解释为必要的限制。

序列表

- <110> 波塔力克斯有限公司
 阿尔蒙, 埃纳特
 切尔特科夫, 罗尔
 阿隆, 萨里
 雪提尔, 尤瑟夫
- <120> 使用稳定化 α -半乳糖苷酶治疗法布里病的治疗方法
- <130> 72305
- <150> US 62/442,537
- <151> 2017-01-05
- <160> 3
- <170> SIP0SequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 398
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> (1) .. (398)
- <223> 人类成熟 α -半乳糖苷酶蛋白质序列
- <400> 1

```

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
1           5           10           15
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
          20           25           30
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
          35           40           45
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
          50           55           60
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
65           70           75           80
Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
          85           90           95
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
          100          105          110
Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
          115          120          125
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp

```

130	135	140
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu		
145	150	155
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr		
165	170	175
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys		
180	185	190
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile		
195	200	205
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp		
210	215	220
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly		
225	230	235
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp		
245	250	255
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile		
260	265	270
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile		
275	280	285
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp		
290	295	300
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val		
305	310	315
Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile		
325	330	335
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe		
340	345	350
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp		
355	360	365
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu		
370	375	380
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu		
385	390	395

<210> 2

<211> 405

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (405)

<223> 具有N'端G的重组A-Gal成熟蛋白并且与SEKDEL融合

<400> 2

Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Ala	Arg	Thr	Pro	Thr	Met	Gly	Trp	Leu	His
1				5					10					15	
Trp	Glu	Arg	Phe	Met	Cys	Asn	Leu	Asp	Cys	Gln	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser
				20				25					30		
Cys	Ile	Ser	Glu	Lys	Leu	Phe	Met	Glu	Met	Ala	Glu	Leu	Met	Val	Ser
				35				40					45		
Glu	Gly	Trp	Lys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Cys	Ile	Asp	Asp	Cys
				50				55					60		
Trp	Met	Ala	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Pro
65					70				75					80	
Gln	Arg	Phe	Pro	His	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser
				85				90					95		
Lys	Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Cys
				100				105					110		
Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr
				115				120					125		
Phe	Ala	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Cys	Tyr	Cys
				130				135					140		
Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Met	Ser	Leu	Ala
145					150				155				160		
Leu	Asn	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Val	Tyr	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu
				165				170					175		
Tyr	Met	Trp	Pro	Phe	Gln	Lys	Pro	Asn	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr
				180				185					190		
Cys	Asn	His	Trp	Arg	Asn	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ser	Trp	Lys	Ser
				195				200					205		
Ile	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Trp	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Glu	Arg	Ile	Val
				210				215					220		
Asp	Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Val	Ile
225					230				235				240		
Gly	Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Gln	Met	Ala	Leu
				245				250					255		
Trp	Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Phe	Met	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	His
				260				265					270		
Ile	Ser	Pro	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala
				275				280					285		

Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly
 290 295 300
 Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala
 305 310 315 320
 Val Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr
 325 330 335
 Ile Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys
 340 345 350
 Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu
 355 360 365
 Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu
 370 375 380
 Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser
 385 390 395 400
 Glu Lys Asp Glu Leu
 405

<210> 3

<211> 404

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (404)

<223> 无N'端G的重组A-Gal成熟蛋白与SEKDEL融合

<400> 3

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
 1 5 10 15
 Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
 20 25 30
 Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
 35 40 45
 Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
 50 55 60
 Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
 65 70 75 80
 Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
 85 90 95
 Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
 100 105 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe			
115	120	125	
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp			
130	135	140	
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu			
145	150	155	160
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr			
165	170	175	
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys			
180	185	190	
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile			
195	200	205	
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp			
210	215	220	
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly			
225	230	235	240
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp			
245	250	255	
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile			
260	265	270	
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile			
275	280	285	
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp			
290	295	300	
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val			
305	310	315	320
Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile			
325	330	335	
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe			
340	345	350	
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp			
355	360	365	
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu			
370	375	380	
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser Glu			
385	390	395	400
Lys Asp Glu Leu			

血浆中的佩冈尼半乳糖苷酶 α (pegunigalsidase alfa)的
浓度对于时间

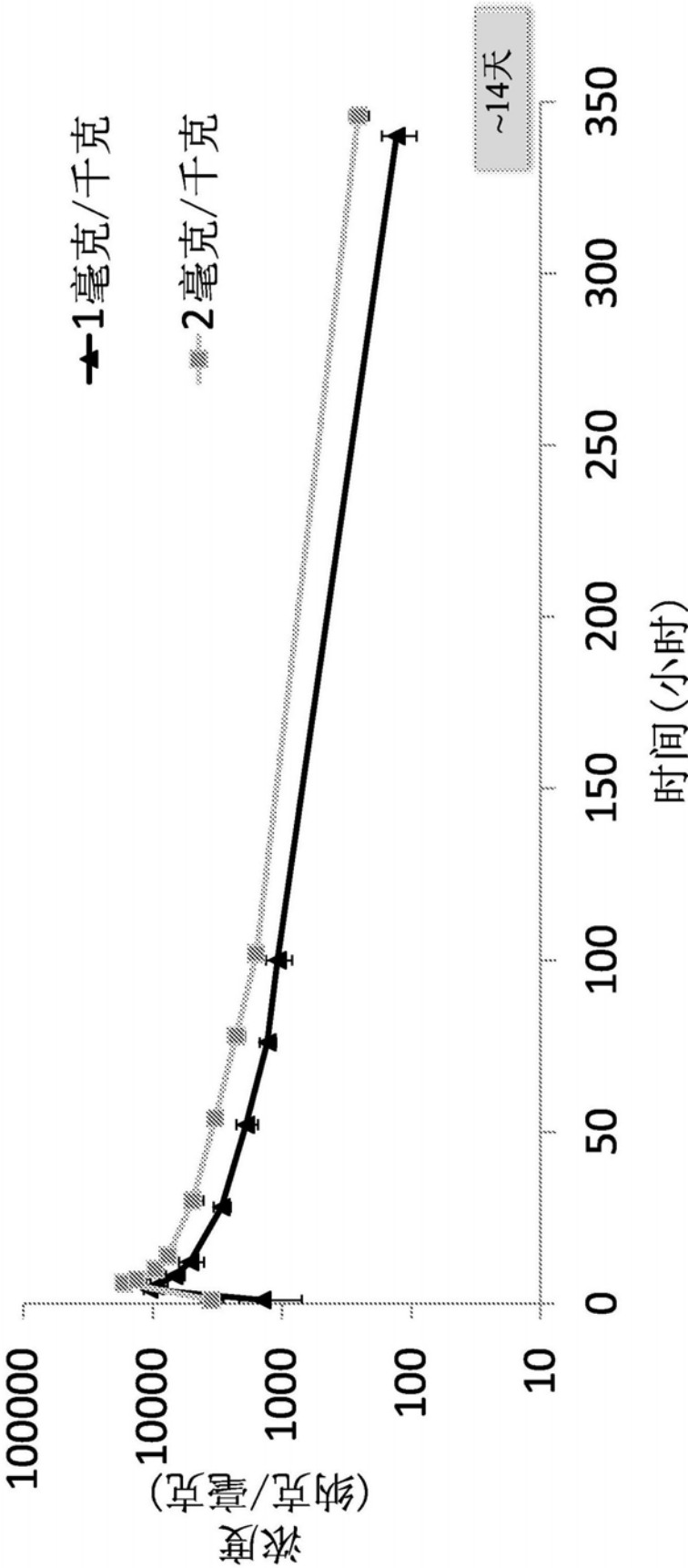


图1

法布瑞酶β的多个药物代谢动力学图谱(在
10小时内的有效酶)

美国人类遗传学杂志
68:711-722, 2001

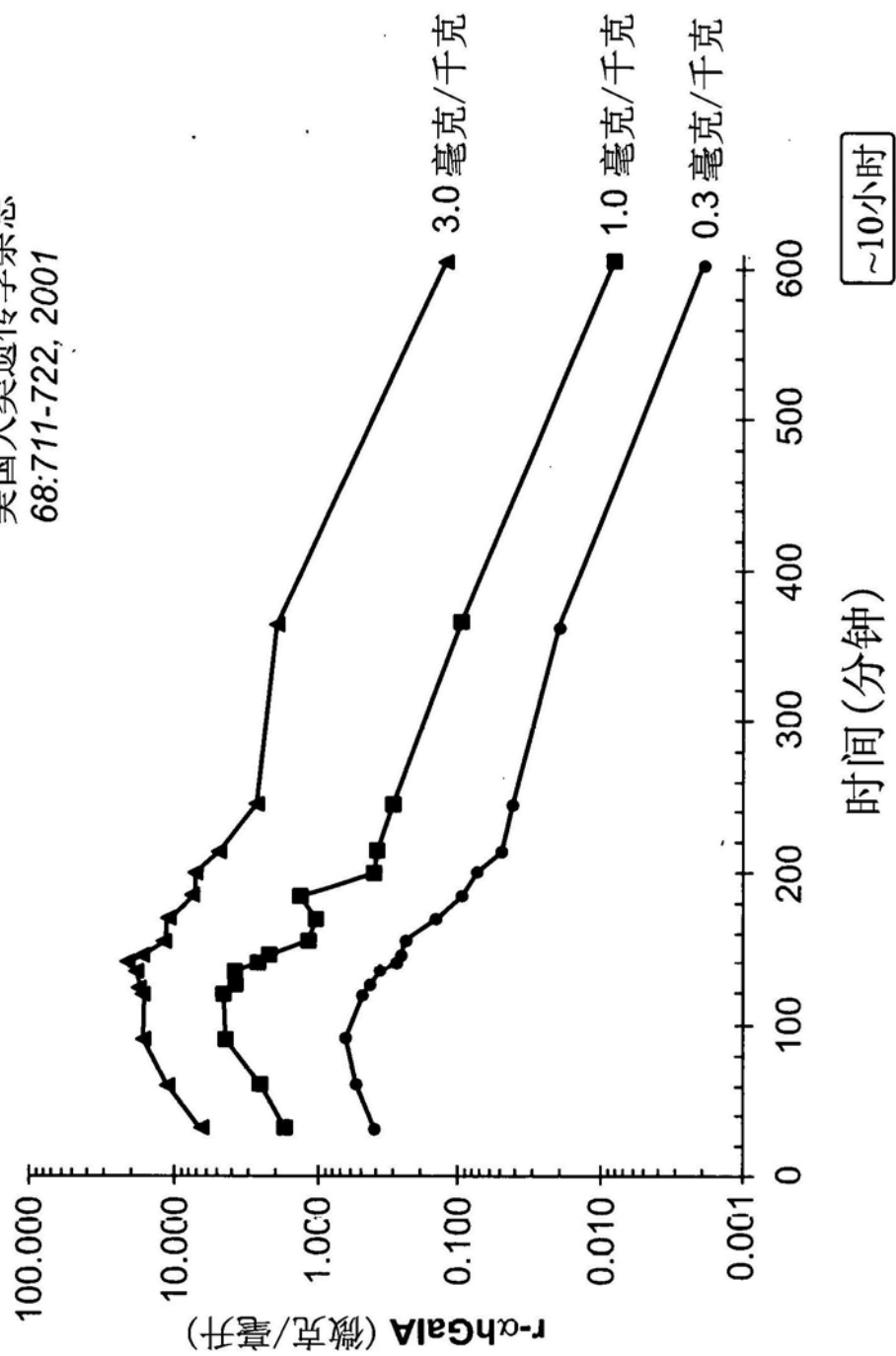


图2

多个药物代谢动力学参数 - 与阿加西酶 β 及阿加西酶 α 相比较

C_{最大}值

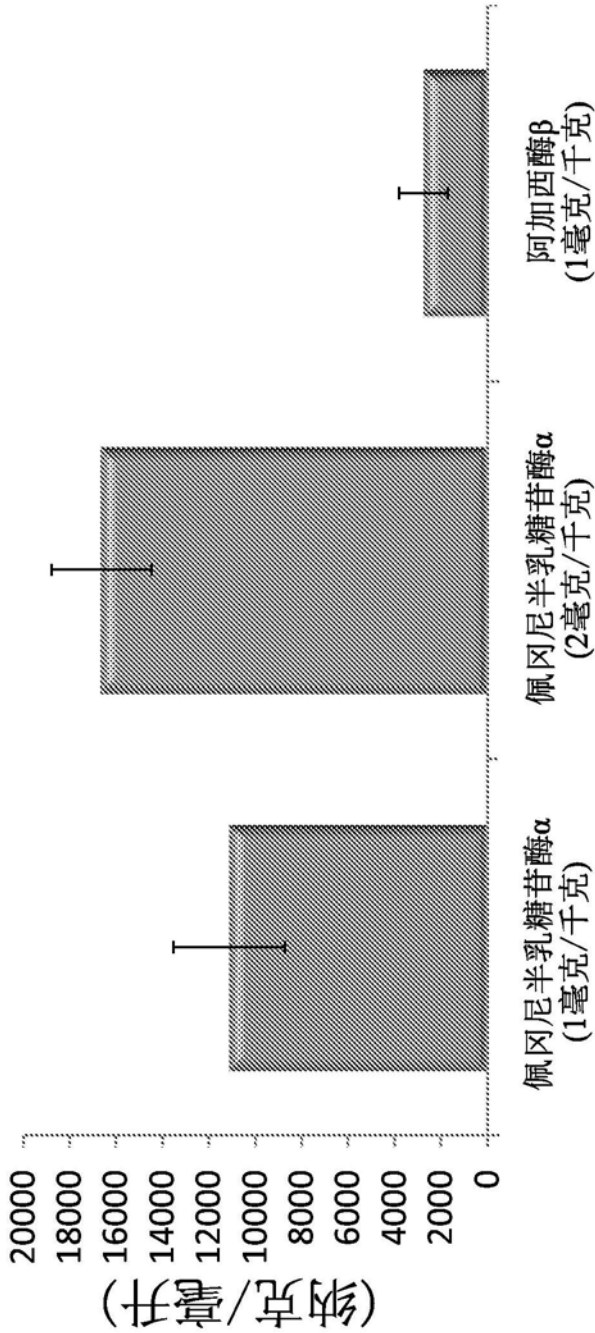


图3A

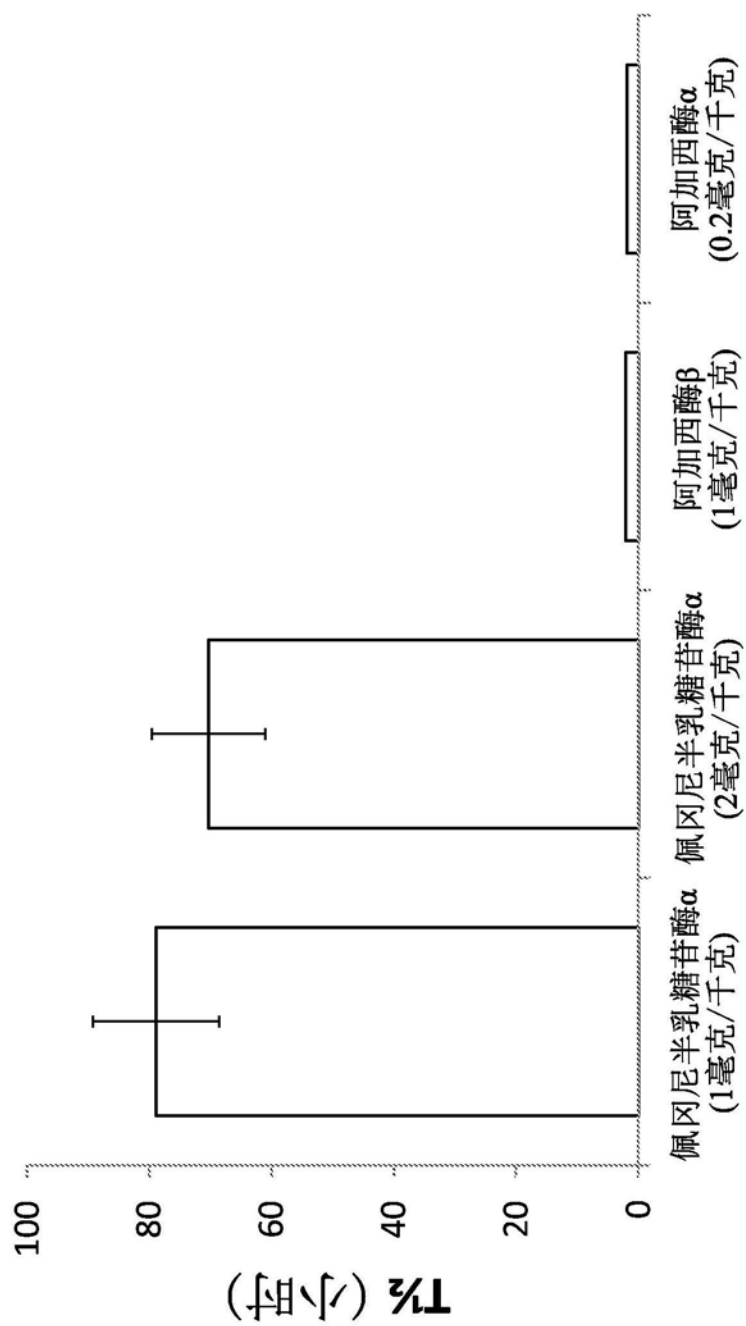
半衰期 ($T_{1/2}$)

图3B

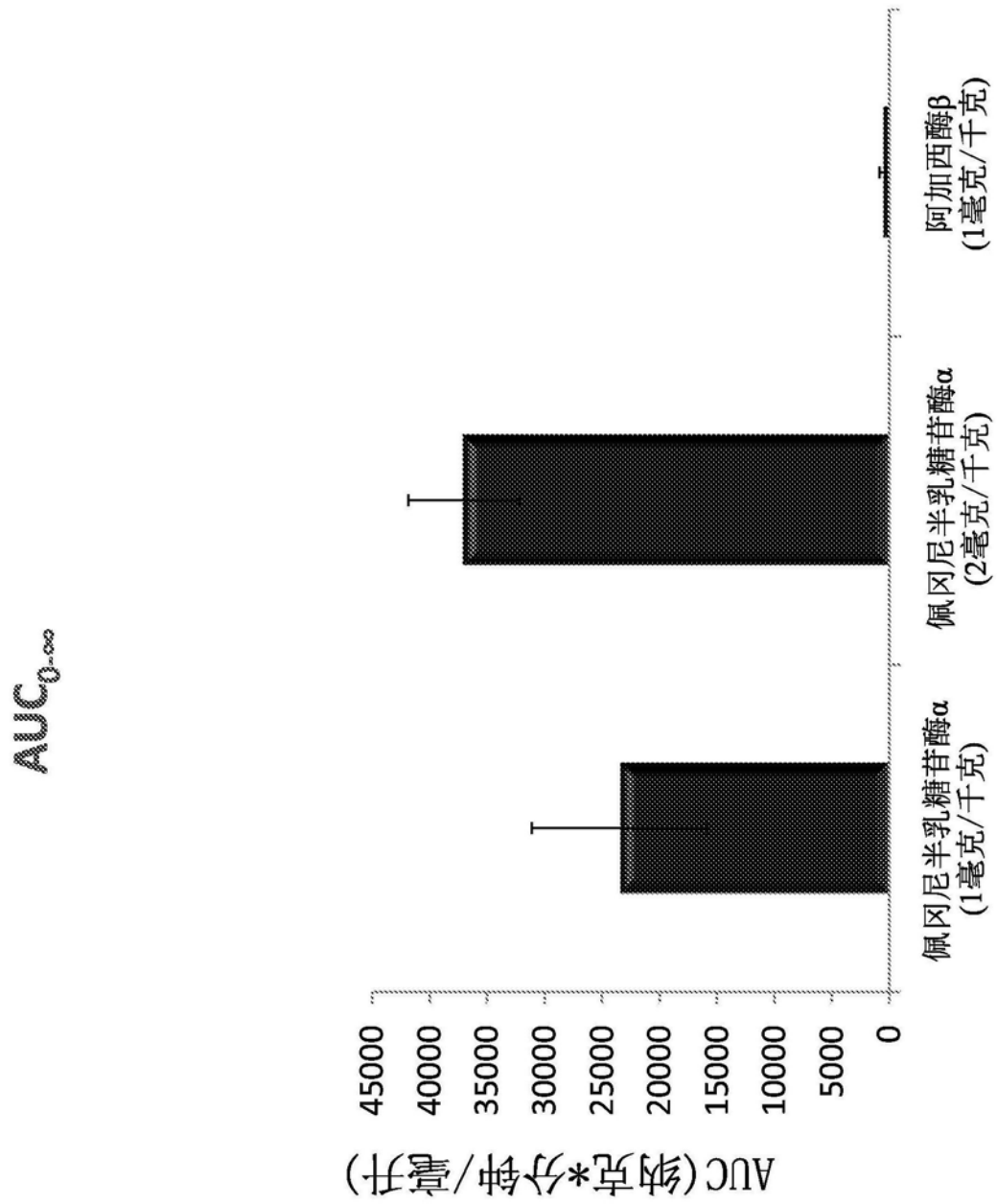


图3C

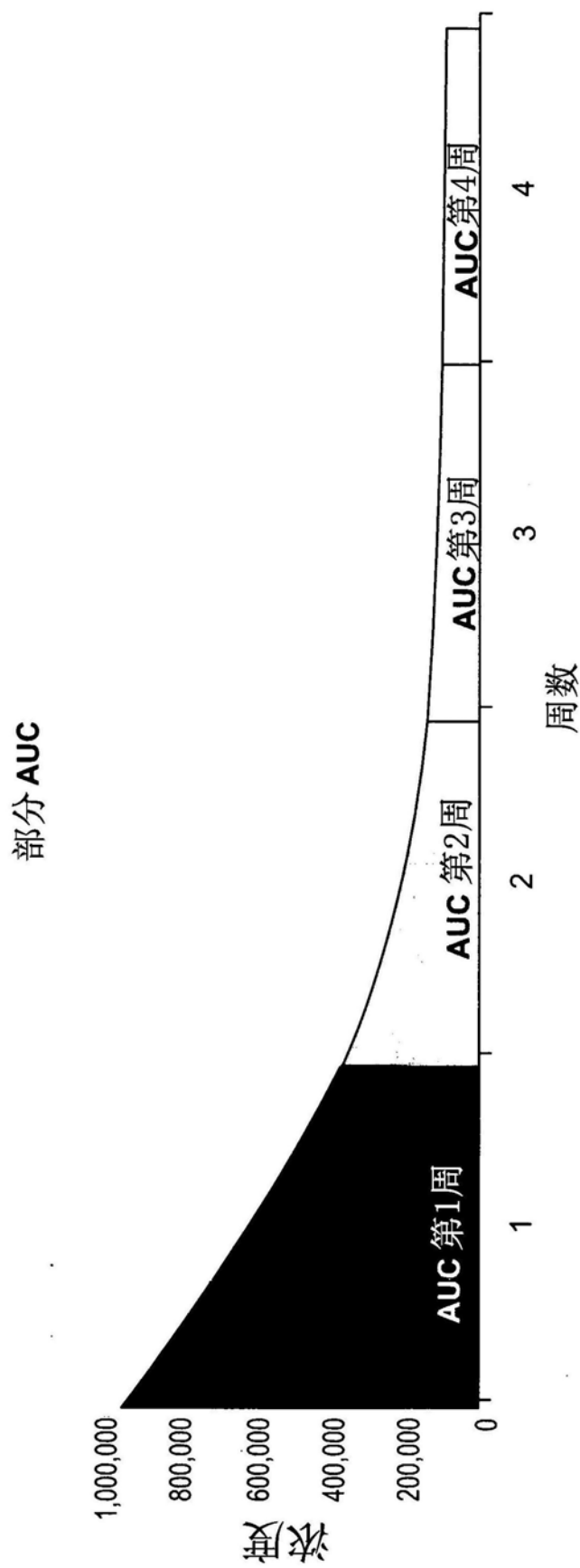


图4A

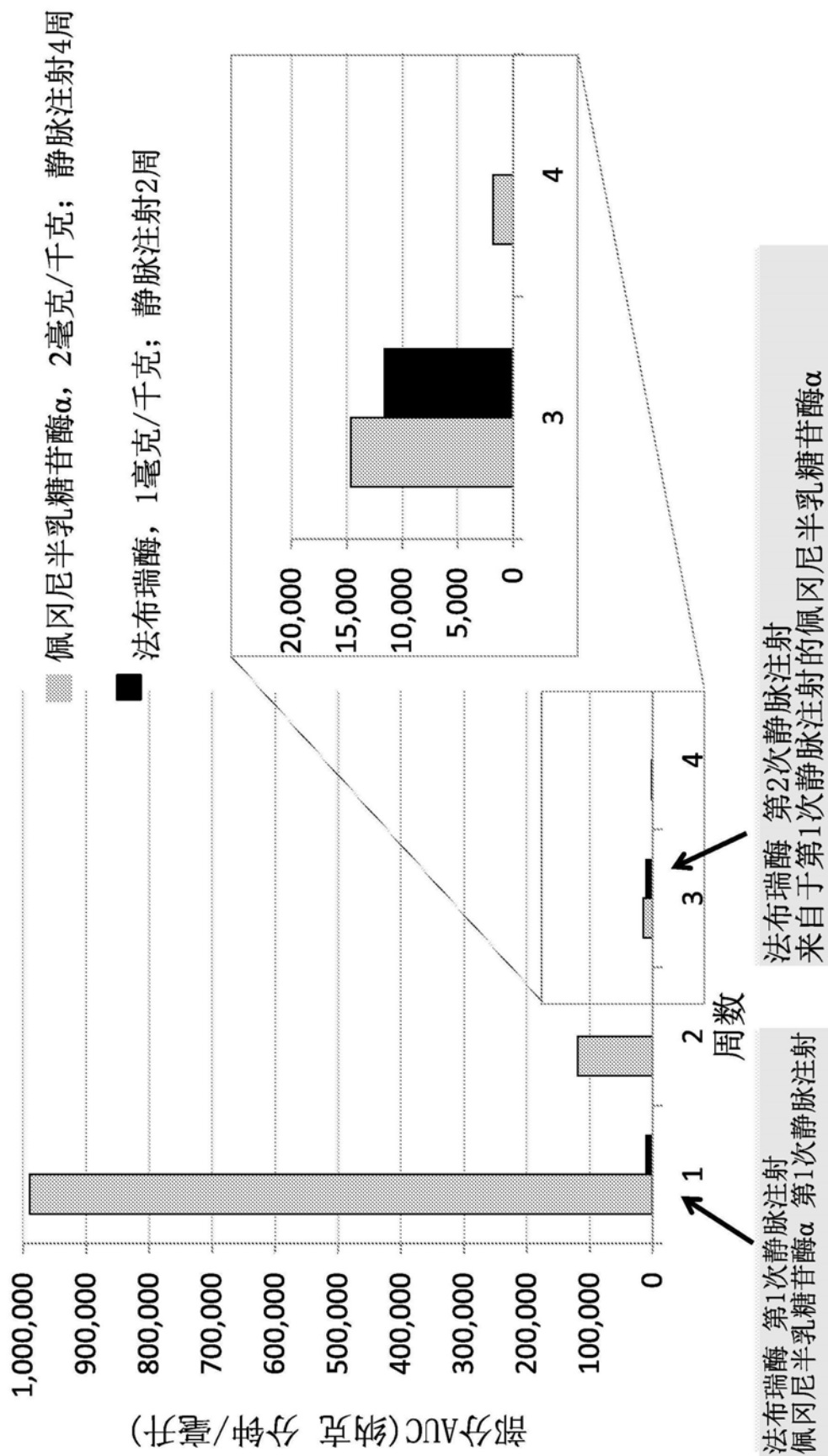


图4B