



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118984840 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 19

(21) 申请号 202380021666.2

(22) 申请日 2023.01.27

(30) 优先权数据

63/304,377 2022.01.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/011727 2023.01.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/147042 EN 2023.08.03

(71) 申请人 西吉隆医疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 加拿大国立研究院

(72) 发明人 E·马基诺 E·皮尔森

G·哈萨克 D·斯塔尼米罗维奇

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理人 秦剑

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

权利要求书8页 说明书74页 附图34页

(54) 发明名称

用于治疗CNS病症的组合物、设备和方法

(57) 摘要

本文描述了BBB转运融合蛋白质、编码所述融合蛋白质的多核苷酸和被遗传修饰成表达并分泌所述融合蛋白质的哺乳动物细胞,以及包含所述融合蛋白质或分泌所述融合蛋白质的经遗传修饰的细胞的组合物、可植入设备和设备制剂,以及制造它们和使用它们治疗各种CNS疾病和疾患,例如具有CNS表现的任何粘多糖贮积症类型的方法。

人前体GAA (SEQ ID NO:15)

```
10      20      30      40      50
MGVRRPCCSH RLLAVCALVS LATAALLGHI LLHDFLLVPR ELSSGSPVLE
60      70      80      90     100
ETEPAHQQGA SRPGRCAQA HPGRFRAVPT QCDVFPNSRF DCAPDKAITQ
110     120     130     140     150
EQCEARGCCY IPAKQGLQGA QMGQFWCFFP PSYPSYKLEN LSSSEMGYTA
160     170     180     190     200
TLTRTPTPTF PKDILTILKLD VMHETENKLA FTIKDPANRN YEVPLKTPHV
210     220     230     240     250
HSRAFSPLYS VEFSEFFGV IVRRQLDGRV LINTTVAPLE FADQFLQLST
260     270     280     290     300
SLPSQYITGL AEHLSPIMLS TSWTRITLWN RDLAPTPGAN LYGSHPFYLA
310     320     330     340     350
LEDGGSARIV FLNLSNAMDV VLQSPALSW RSTGGILVLI IFLGPEPKSV
360     370     380     390     400
VQQYLDVGVY PFMPPYWGIG FHLCRWGYSS TAITRQVVEN MTRAHFPLDV
410     420     430     440     450
QWNLDMYDS RRDFTFNKDG FRDFFAMVQE LHQGGRRYMM IVDPAISSSG
460     470     480     490     500
FAGSYRPTDE GLRRGVFITN ETGQFLIGKV WPGSTAFFDP TNPTALAWWE
510     520     530     540     550
DNVAEFHQDV PFDGMIMDMN EPSNFIRGSE DGCNNLEEN PPYVPGVVG
560     570     580     590     600
TLQAATICAS SHQPLSTHYN LHNLYGLTEA IASHRALYKA RGRPPFVISR
610     620     630     640     650
STFAGHGRYA GHWTDVWSS WEQLASSVPE ILQFNLLGVE LVGADVCGFL
660     670     680     690     700
GNTSEELCVR WTQLGAFYFP MRNHSLSL PQEPYSFSEP AQQAMRKALT
710     720     730     740     750
LRYALLPHLY TLFRQARVAG ETVARPLFE FPKDSSSTTV DHQLLNGEAL
760     770     780     790     800
LITPVLQAGK AEVTGYFPLG TWYDLQTVFV EALGSLPPFP AAPREPAIHS
810     820     830     840     850
EGQWVTLFAP LDTINVHLRA GYIIFLQSPG LTTTESRQCF MALAVALTKG
860     870     880     890     900
GEARGELFWD DGRSLEVLER GAYTQVIFLA RNNTIVNELV RVTSEGAQLQ
910     920     930     940     950
LQKVTVLGVA TAPQQVLSNG VPVSNFTYSP DTKVLDCVS LLMGEQFLVS
```

WC

1. 一种融合蛋白质,其包含由以下定义的N末端至C末端结构:式I:AB-L1-RB-L2-C或式II:RB-L1-AB-L2-C,

其中对于式I和式II中的每一者:

AB包含与人血清白蛋白(HSA)结合的结构域;

L1可存在或不存在,包含第一接头氨基酸序列;

RB包含与人IGF1R(hIGF1R)的胞外结构域结合的结构域;

L2可存在或不存在,包含与所述第一接头氨基酸序列相同或不同的第二接头氨基酸序列;并且

C是货物部分,任选地所述货物部分包含多肽的氨基酸序列,实质上由或由多肽的氨基酸序列组成。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其由式I:AB-L1-RB-L2-C定义。

3. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中AB和RB中的每一者均具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量,并且任选地所述货物部分具有约1kD至约200kD,或约2kD至约100kD的分子量。

4. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中

(i) AB包含对应于抗HSA抗体的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列的集合,任选地所述第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列的集合选自:

(a) GRTFIAYA (SEQ ID NO:1)、ITNFAGGTT (SEQ ID NO:2)、AADRSAQTMQRVLPY (SEQ ID NO:3);

(b) GFLLRSNTM (SEQ ID NO:41)、IRPSGLT (SEQ ID NO:42)、HTRPPFQRDS (SEQ ID NO:43);

(c) GFLLRSNTM (SEQ ID NO:41)、IRPSGLT (SEQ ID NO:42)、ATRPPFQRDS (SEQ ID NO:44);

(d) GRTFDNYVM (SEQ ID NO:45)、ISGSGSIT (SEQ ID NO:46)、AAGSRRTYYREPKFYPS (SEQ ID NO:47);

(e) GSTFSSSSV (SEQ ID NO:48)、ITSGGST (SEQ ID NO:49)、NVAGRNWVPISRYSPGPY (SEQ ID NO:50);和

(f) GSTFSSSSV (SEQ ID NO:48)、ITSGGST (SEQ ID NO:49)、AVAGRNWVPISRYSPGPY (SEQ ID NO:51);或者

(ii) AB包含选自以下的氨基酸序列,实质上由或由选自以下的氨基酸序列组成:

(a) QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWFR QAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGR FTISRDNAKTTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAADRSAQTMQRVLPYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:4) 或其保守取代的变体;

(b) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWFR QAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGR FTISRDNAKTTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMQRVLPYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5) 或其保守取代的变体;

(c) QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVGPGLLRSNTMGWYR QAPGKERELVAFIRPSGLTNYNDAVQGRFT ISRDNAKNTVYLQM NALKPEDTAVYYCHTRPPFQRDSWGQGTQV TVSS (SEQ ID NO:52) 或其保守取代

的变体;

(d) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGPGFLLRSNTMGWYR QAPGKERELVAFIRPSGLTNYNDVQGRFT ISRDNKNTVYVLQM NSLRAEDTAVYYCHTRPPFQRDSWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:53) 或其保守取代的变体;

(e) QVQLVESGGGFVQAGGSLRLSCAASGRTFDNYVMAWFR QAPGKEREFVASISGSGSITNYANSVKDRF TISRDSAKNAIYLMN SLKPEDTALYYCAAGSRRTYYREPKFYPSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:54) 或其保守取代的变体;

(f) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFDNYVMAWFR QAPGKGLEFVSSISGSGSITNYANSVKDRF TISRDNKNTLYLQM SLRAEDTAVYYCAAGSRRTYYREPKFYPSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:55) 或其保守取代的变体;

(g) QVKLEESGGGLVQAGGSLKLSCAASGSTFSSSSVGWYRQ APGQQRELVAAITSGGSTNTADSVKGRFT MSRDNAKNTVYLMR DLKPEDTAVYYCNVAGRNWVPISRYSPPGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:56) 或其保守取代的变体;和

(h) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSSSSVGWYRQ APGKGLELVSAITSGGSTNTADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCNVAGRNWVPISRYSPPGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:57) 或其保守取代的变体。

5. 如权利要求4所述的融合蛋白质,其中AB中的所述第一氨基酸序列、所述第二氨基酸序列和所述第三氨基酸序列是:GRTFIAYA (SEQ ID NO:1) 或其保守取代的变体;ITNFAGGTT (SEQ ID NO:2) 或其保守取代的变体;以及AADRSAQTMRQVRPVLPI (SEQ ID NO:3) 或其保守取代的变体。

6. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中AB包含来自sdAb的氨基酸序列,实质上由或由来自sdAb的氨基酸序列组成。

7. 如权利要求6所述的融合蛋白质,其中AB实质上由或由选自以下的氨基酸序列组成:

(i) SEQ ID NO:4;

(ii) SEQ ID NO:5;或

(iii) 抗体的重链可变区的氨基酸序列,所述抗体与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成的sdAb交叉竞争结合至HSA。

8. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质经由AB结合至HSA的结构域1 (DI) 或结构域2 (DII) 并且基本上不抑制人FcRn与HSA的结合。

9. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中如通过表面等离子体共振在25℃下所确定,所述融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由所述AB结构域以小于约0.1nM至约1,000nM的解离常数 (K_D) 亲和力结合至HSA,任选地其中所述 K_D 是约0.5nM至约500nM、约1nM至约250nM、约5nM至约50nM、约10nM至约25nM,或约0.5nM至约1nM。

10. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质在25℃下在约5.5至约7.4的pH范围内经由AB结合至至少一种哺乳动物血清白蛋白直系同源物,任选地其中所述融合蛋白质经由AB结合至选自由小鼠血清白蛋白、大鼠血清白蛋白、仓鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白、豚鼠白蛋白、猪白蛋白、猫白蛋白、狗白蛋白和非人灵长类动物血清白蛋白组成的组的两种或更多种哺乳动物血清白蛋白,任选地其中所述非人灵长类动物血清白蛋白是食蟹猴血清白蛋白或恒河猴血清白蛋白。

11. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质经由所述RB结构域结合至人脑内皮细胞表面上表达的hIGF1R,任选地其中所述融合蛋白质经由RB结合至包含FENFLHNSIFVPR(SEQ ID NO:6)的hIGF1R胞外结构域中的表位。

12. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质基本上不结合至人胰岛素受体(h-IR),任选地其中所述融合蛋白质基本上不抑制胰岛素、胰岛素生长因子1(IGF1)或胰岛素生长因子2(IGF2)与hIGF1R的结合。

13. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中如通过表面等离子体共振在25℃下所确定,所述融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB以约0.1nM至约1,000nM的 K_D 亲和力结合至hIGF1R,任选地其中所述 K_D 是(i)约0.2nM至约500nM、250nM、100nM、50nM、25nM或10nM中的任一个;(ii)约0.5nM至约250nM、100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个;或(iii)约1nM至约100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个。

14. 如权利要求13所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质经由RB以1nM至10nM的 K_D 结合至hIGF1R。

15. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质在25℃下且在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB结合至至少一种哺乳动物IGF1R直系同源物,任选地其中所述融合蛋白质经由RB结合至选自由小鼠IGF1R、大鼠IGF1R、仓鼠IGF1R、兔IGF1R、豚鼠IGF1R、狗IGF1R、猫IGF1R和非人灵长类动物IGF1R组成的组的两种或更多种哺乳动物IGF1R蛋白质,任选地其中所述非人灵长类动物IGF1R是食蟹猴IGF1R或恒河猴IGF1R。

16. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其中

(i) RB包含对应于抗hIGF1R抗体的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列,任选地所述第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列选自:

(a) GRTIDNYA(SEQ ID NO:7), IDWGDGGX, 其中X是A或T(SEQ ID NO:8), AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:9);

(b) GRTIDNYA(SEQ ID NO:7)、IDWGDGGA(SEQ ID NO:10)、AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:9);

(c) EYPSNFYA(SEQ ID NO:58)、VSRDGLTT(SEQ ID NO:59)、AIVITGVWNKVDVNSRSYHY(SEQ ID NO:60);和

(d) GGTVSPTA(SEQ ID NO:61)、ITWSRGTT(SEQ ID NO:62)、AASTFLRILPEESAYTY(SEQ ID NO:63);或者

(ii) RB包含选自以下的氨基酸序列,实质上由或由选自以下的氨基酸序列组成:

(a) QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSR QAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRF TISRDNAGKTMYL QMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVS S(SEQ ID NO:11)或其保守取代的变体;

(b) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVR QAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRF TISRDNASKNTMYL QMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVS S(SEQ ID NO:12)或其保守取代的变体;

(c) QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFR QAPGKEREFVAGVSRDGLTTLYADSVKGRF TMSRDNAKNTVDL QMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGTQV TVSS(SEQ ID NO:67)或

其保守取代的变体;

(d) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQ APGKEREFSVSGVSRDGLTTLTLYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:68), 或其保守取代的变体;

(e) QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFR QAPGKEREFGHITWSRGTTTRVASSVKDRF TISRDSAKNTVYLQM NSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:69) 或其保守取代的变体;和

(f) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVR QAPGKGLEWVGHITWSRGTTTRYASSVKGRF TISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:70) 或其保守取代的变体。

17. 如权利要求16所述的融合蛋白质, 其中RB中的所述第一氨基酸序列、所述第二氨基酸序列和所述第三氨基酸序列是: GRTIDN YA (SEQ ID NO:7), 或其保守取代的变体; IDWGDGGA (SEQ ID NO:10), 或其保守取代的变体; 以及AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO:9), 或其保守取代的变体。

18. 如权利要求17所述的融合蛋白质, 其中RB实质上由或由以下组成:

(i) SEQ ID NO:11;

(ii) SEQ ID NO:12; 或

(iii) 与由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12组成的sdAb交叉竞争结合至hIGF1R的抗体的重链可变区的氨基酸序列。

19. 如权利要求1所述的融合蛋白质, 其中存在L1和L2, 任选地其中L1和L2中的每一者均是长度小于50个氨基酸, 或长度在约15与30个氨基酸之间, 或长度在约20与25个氨基酸之间的接头肽。

20. 如权利要求19所述的融合蛋白质, 其中L1和L2中的一者或两者实质上由或由(GGGGS)_m组成, 其中m是4或5。

21. 如权利要求20所述的融合蛋白质, 其中L1和L2中的每一者均实质上由或由以下组成: GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:14)。

22. 如权利要求1所述的融合蛋白质, 其中所述货物部分是选自以下组成的组的货物多肽: 酶、生长因子、细胞因子, 或抗体或其抗原结合片段, 任选地其中所述货物多肽包含由野生型人基因编码的成熟氨基酸序列。

23. 如权利要求22所述的融合蛋白质, 其中所述货物多肽是酸性 α -葡萄糖苷酶蛋白质(GAA)、 α -半乳糖苷酶A (GLA) 蛋白质、 α -L-艾杜糖醛酸酶 (IDUA) 蛋白质、 α -N-乙酰基-氨基葡萄糖苷酶 (NAGLU) 蛋白质、 β -葡萄糖醛酸酶 (GUSB) 蛋白质、 β -葡萄糖苷酶 (GBA) 蛋白质、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 (IDS) 蛋白质、乙酰肝素- α -氨基葡萄糖苷N-乙酰转移酶 (HGSNAT) 蛋白质、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶 (GNS) 蛋白质或N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶 (SGSH) 蛋白质, 任选地其中所述货物多肽不是IDS蛋白质。

24. 如权利要求22或23所述的融合蛋白质, 其中所述货物多肽是IDUA蛋白质, 任选地其中所述IDUA蛋白质实质上由或由以下组成:

(i) SEQ ID NO:22的氨基酸26、27或28至氨基酸653; 或

(ii) SEQ ID NO:22的氨基酸27-653。

25. 如权利要求24所述的融合蛋白质,其具有在野生型人IDUA蛋白质的相应酶活性的80%-120%以内的IDUA酶活性。

26. 如权利要求22或23所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是IDS蛋白质,任选地其中所述融合蛋白质包含SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:94,实质上由或由SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:94组成。

27. 如权利要求26所述的融合蛋白质,其具有在野生型人IDS蛋白质的相应酶活性的80%-120%以内的IDS酶活性。

28. 如权利要求1所述的融合蛋白质,其包含图3A、图3B、图3C、图3D、图3E或图3F中所示的hIDUA融合蛋白质的氨基酸序列,实质上由或由所述氨基酸序列组成,任选地,其中所述融合蛋白实质上由或由SEQ ID NO:29组成,其中m和n中的每一者=4。

29. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求1所述的融合蛋白质的第一核苷酸序列,任选地其中所述多核苷酸是经分离的双链DNA分子中的一条链。

30. 如权利要求29所述的多核苷酸,其中所述第一核苷酸序列可操作地连接至编码所述融合蛋白质的分泌信号序列的核苷酸序列,任选地其中所述分泌信号序列包含以下,实质上由或由以下组成:SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:86。

31. 如权利要求30所述的多核苷酸,其中所述分泌信号序列实质上由或由SEQ ID NO:79组成。

32. 如权利要求29所述的多核苷酸,其中所述第一核苷酸序列可操作地连接至启动子序列和polyA信号序列,任选地其中所述启动子序列包含SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34,实质上由或由SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34组成,并且任选地其中所述polyA信号序列包含SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37,实质上由或由SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37组成。

33. 如权利要求32所述的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:39。

34. 一种经遗传修饰的哺乳动物细胞,其用权利要求29所述的多核苷酸瞬时或稳定转染,任选地其中所述细胞衍生自人类细胞。

35. 如权利要求34所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞,其中所述多核苷酸被插入到所述哺乳动物细胞的基因组中的至少一个位置中。

36. 如权利要求34所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞,其衍生自RPE细胞,任选地ARPE-19细胞。

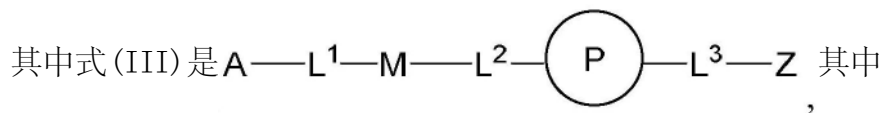
37. 如权利要求34所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞,其衍生自诱导型多能干细胞(iPSC)或间充质干细胞(MSC)。

38. 一种包含多个经遗传修饰的细胞的组合物,其中所述多个经遗传修饰的细胞中的每个细胞均为如由权利要求34所限定的经遗传修饰的细胞,任选地其中所述多个经遗传修饰的细胞是从单克隆细胞系的培养物获得的。

39. 一种可植入设备,所述可植入设备包括至少一个含细胞隔室,所述含细胞隔室包括权利要求34所述的经遗传修饰的细胞或权利要求38所述的组合物;并且进一步包括至少一种用于在所述设备被植入到受试者中时减轻异物反应(FBR)的装置,任选地其中所述设备包括直径为约0.75mm至约2mm的球形两隔室水凝胶胶囊。

40. 如权利要求39所述的可植入设备,其中所述含细胞隔室包括聚合物组合物,其中所述聚合物组合物包含用肽共价修饰的藻酸盐,其中所述肽实质上由或由GRGDSP (SEQ ID NO:89)、GGRGDSP (SEQ ID NO:90)或GGGRGDSP (SEQ ID NO:91)组成。

41. 如权利要求39所述的可植入设备,其中所述含细胞隔室被屏障隔室围绕,所述屏障隔室包括藻酸盐水凝胶和任选的设置在所述屏障隔室的外表面上的式(III)化合物或其药学上可接受的盐,



A是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-、-N(R^C)-、-N(R^C)C(O)-、-C(O)N(R^C)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烯基)-、-N(R^C)N(R^D)-、-NCN-、-C(=N(R^C)(R^D))O-、-S-、-S(O)_x-、-OS(O)_x-、-N(R^C)S(O)_x-、-S(O)_xN(R^C)-、-P(R^F)_y-、-Si(OR^A)₂-、-Si(R^G)(OR^A)-、-B(OR^A)-或金属,其中的每一者均任选地连接至附接基团(例如,本文所述的附接基团)且任选地被一个或多个R¹取代;

L¹和L³中的每一者均独立地为键、烷基或杂烷基,其中每个烷基和杂烷基均任选地被一个或多个R²取代;

L²是键;

M是不存在、烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R³取代;

P是不存在、环烷基、杂环基,或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R⁴取代;

Z是氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、-OR^A、-C(O)R^A、-C(O)OR^A、-C(O)N(R^C)(R^D)、-N(R^C)C(O)R^A、-N(R^C)(R^D)、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁵取代;

每个R^A、R^B、R^C、R^D、R^E、R^F和R^G均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、叠氮基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个R⁶取代;

或者R^C和R^D与它们所附接至的氮原子一起形成任选地被一个或多个R⁶取代的环(例如,5-7元环);

每个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、叠氮基、氧代基、-OR^{A1}、-C(O)OR^{A1}、-C(O)R^{B1}、-OC(O)R^{B1}、-N(R^{C1})(R^{D1})、-N(R^{C1})C(O)R^{B1}、-C(O)N(R^{C1})、SR^{E1}、S(O)_xR^{E1}、-OS(O)_xR^{E1}、-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}、-S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})、-P(R^{F1})_y、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

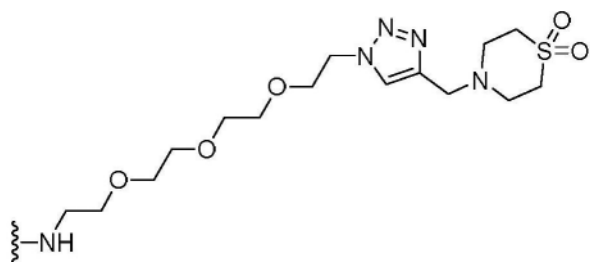
每个R^{A1}、R^{B1}、R^{C1}、R^{D1}、R^{E1}和R^{F1}均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

每个R⁷均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、氧代基、羟基、环烷基或杂环基;

x是1或2;并且

y 是2、3或4。

42. 如权利要求41所述的可植入设备,其中所述屏障隔室包括用



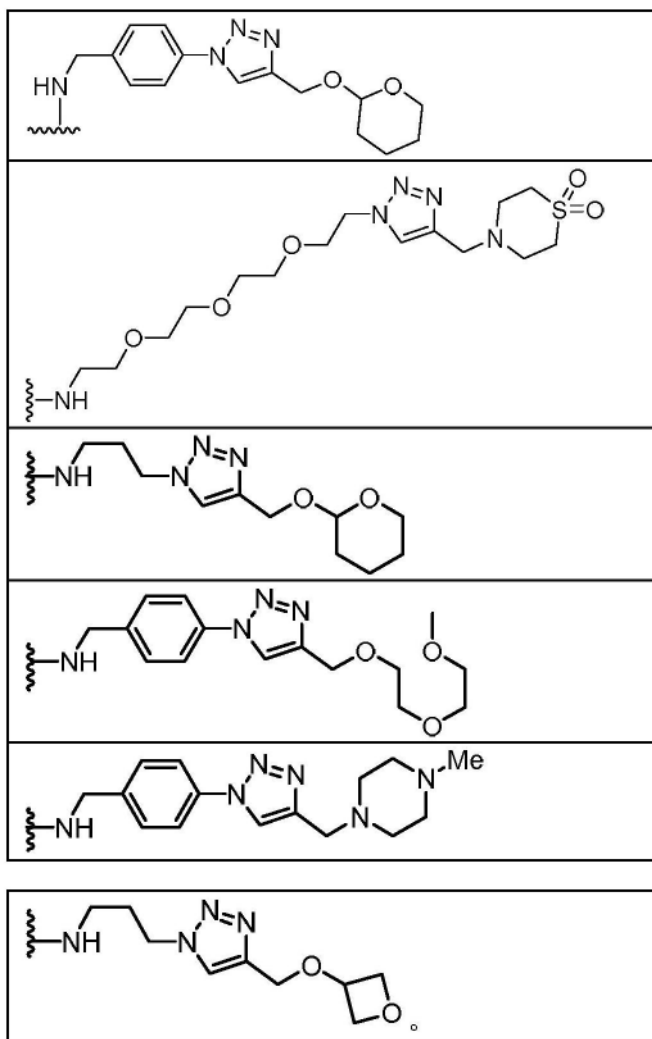
或其药学上可接受的盐化学修饰的藻酸盐。

43. 一种设备制剂,其中所述制剂中的每个设备均为权利要求39所述的设备。

44. 一种水凝胶胶囊, 其包括:

(i) 内部隔室,所述内部隔室包括包封在第一聚合物组合物中的多个权利要求34所述的经遗传修饰的细胞,其中所述第一聚合物组合物包含形成水凝胶的聚合物,任选地其中所述内部隔室中的所述经遗传修饰的细胞的浓度是至少4000万个细胞/ml所述第一聚合物组合物;和

(ii) 屏障隔室, 所述屏障隔室围绕所述内部隔室并且包括第二聚合物组合物, 其中所述第二聚合物组合物包含用至少一种式 (III) 化合物或其药学上可接受的盐共价修饰的藻酸盐, 任选地其中所述式 (III) 化合物选自下表提供的化合物:



45. 一种胶囊组合物,其包含在药学上可接受的载体中的多个权利要求44所述的水凝胶胶囊。

46. 如权利要求45所述的胶囊组合物,其中所述多个水凝胶胶囊中的经遗传修饰的细胞表达并分泌IDUA融合蛋白质,所述IDUA融合蛋白质实质上由或由SEQ ID NO:29组成,其中m和n中的每一者=4。

47. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的融合蛋白质和药学上可接受的载体。

48. 如权利要求47所述的药物组合物,其中所述融合蛋白质实质上由或由SEQ ID NO:29组成,其中m和n中的每一者=4。

49. 一种预防或治疗受试者的中枢神经系统(CNS)的疾病或疾患的方法,所述方法包括:

- (i) 向所述受试者施用权利要求47所述的药物组合物;
- (ii) 植入权利要求39中任一项所述的设备或设备制剂;或
- (iii) 植入权利要求45所述的胶囊组合物。

50. 一种治疗被诊断患有1型粘多糖贮积症(MPS-1)疾病的人受试者的方法,所述方法包括:

- (i) 提供权利要求46所述的胶囊组合物;以及
- (ii) 将所述胶囊组合物设置于所述受试者的身体中,任选地其中所述设置步骤包括将所述胶囊组合物放置于所述受试者的腹膜内间隙中或腹膜腔大囊中。

用于治疗CNS病症的组合物、设备和方法

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求2022年1月28日提交的美国专利申请第63/304,377号的优先权。前述申请的全部内容通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 从理论上讲,许多神经变性疾病和其它中枢神经系统(CNS)病症可通过诸如酶、细胞因子和抗体的蛋白质治疗。然而,使用基于蛋白质的疗法来治疗CNS病症的前景受到了难以将大于500道尔顿的分子转运穿过血脑屏障(BBB)的限制,血脑屏障由内衬血管并通过紧密连接彼此连接的脑内皮细胞(BEC)形成。受体介导的转胞吞作用(RMT)是已被探索以增加蛋白质穿过BBB的递送的多种方法之一。RMT方法通常采用融合蛋白质的静脉内或皮下施用,该融合蛋白质将治疗性蛋白质连接至结合BEC表面上表达的内源性受体之一的分子。受体结合后,RMT过程需要受体-融合蛋白质复合物的内化和融合蛋白质在细胞近腔侧的胞吐作用。RMT的候选靶受体包括转铁蛋白受体、胰岛素受体、胰岛素样生长因子-1受体(IGF1R)、低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白质1和2(LRP-1和LRP-2)、白喉毒素受体和TMEM30A。在临床前和临床研究中获得的结果表明,多种因素可影响穿过BBB的治疗性蛋白质的量和/或活性(包括融合蛋白质的血浆半衰期及其对RMT靶受体的结合亲和力)。

发明内容

[0004] 本文描述了BBB转运融合蛋白质,其包含位于与人血清白蛋白(HSA)和与人IGF1R(hIGF1R)的胞外部分结合的单独结构域的C末端的货物部分,例如具有可用于治疗或诊断目标中枢神经系统(CNS)疾患或病症的活性的分子。在一个实施方案中,IGF1R结合结构域设置在HSA结合结构域与货物部分之间。在另一个实施方案中,HSA结合结构域设置在IGF1R结合结构域与货物部分之间。在一个实施方案中,接头部分设置在两个结合结构域之间和/或hIGF1结合结构域与货物部分之间。在一个实施方案中,HSA结合结构域和hIGF1R结合结构域中的一者或两者具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量。在一个实施方案中,HSA结合结构域和hIGF1R结合结构域中的每一者的氨基酸序列来自单链Fab(scFab)、单链Fv(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。在一个实施方案中,货物部分(分子)具有约1kD至约200kD,或约2kD至约100kD的分子量。在一个实施方案中,货物部分(分子)实质上由或由多肽(例如,细胞因子、酶或抗体)的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,接头部分是长度小于50个氨基酸的接头肽。

[0005] 在一个方面,本公开的特征是一种BBB转运融合蛋白质,其包含由式I:AB-L1-RB-L2-C或由式II:RB-L1-AB-L2-C定义的一级结构,其中在每个式中,AB包含HSA结合结构域,L1包含第一接头氨基酸序列,RB包含hIGF1R结合结构域,L2包含第二接头氨基酸序列,并且C包含货物多肽的氨基酸序列。

[0006] 在一个实施方案中,融合蛋白质经由AB结合至HSA的结构域1(DI)或结构域2(DII),并且基本上不抑制人FcRn(h-FcRn)与HSA的结合。在一个实施方案中,如通过表面等

离子体共振在25℃下所确定,融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由AB结构域以小于约1nM至约100nM的 K_D 亲和力结合至HSA。在一些实施方案中,融合蛋白质还在25℃下在约5.5至约7.4的pH范围内经由AB结合至至少一种哺乳动物血清白蛋白直系同源物。在一个实施方案中,白蛋白直系同源物来自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、猪、猫、狗或非人灵长类动物(例如,食蟹猴或恒河猴)。

[0007] 在一个实施方案中,AB包含对应于抗HSA抗体(例如,具有两条重链和两条轻链的常规抗体、scFab、scFv、sdAb)的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一、第二和第三氨基酸序列。在一个实施方案中,AB中的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列是:GRTFIAYA(SEQ ID NO:1)或其保守取代的变体;ITNFAGGTT(SEQ ID NO:2)或其保守取代的变体;以及AADRSAQTMRQVRPVLPLY(SEQ ID NO:3)或其保守取代的变体。

[0008] 在一个实施方案中,AB实质上由或由以下组成:QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFTISRDNKTTVYLMNSLKPEDTALYYCAADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:4),或其保守取代的变体。在一个实施方案中,AB实质上由或由以下组成:QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFTISRDNKTTVYLMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:5),或其保守取代的变体。在一个实施方案中,AB实质上由或由抗体的重链可变区的氨基酸序列组成,该抗体与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成的sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0009] 融合蛋白质经由RB结构域结合至人脑内皮细胞表面上表达的hIGF1R。在一些实施方案中,融合蛋白质基本上不结合至人胰岛素受体(h-IR)。在一些实施方案中,融合蛋白质基本上不抑制胰岛素、胰岛素生长因子1(IGF1)或胰岛素生长因子2(IGF2)与hIGF1R的结合。在一个实施方案中,融合蛋白质经由RB结合至包含FENFLHNSIFVPR(SEQ ID NO:6)的hIGF1R胞外结构域中的表位。在一个实施方案中,如通过表面等离子体共振在25℃下所确定,融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB以约0.5nM至约50nM的 K_D 亲和力结合至hIGF1R。在一些实施方案中,融合蛋白质还在25℃下且在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB结合至至少一种哺乳动物IGF1R直系同源物。在一个实施方案中,IGF1R直系同源物来自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、狗、猫,或非人灵长类动物(例如,食蟹猴或恒河猴)。在一个实施方案中,RB包含对应于抗hIGF1R抗体(例如,具有两条重链和两条轻链的常规抗体、scFab、scFv、sdAb)的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一、第二和第三氨基酸序列。在一个实施方案中,RB中的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列是GRTIDNYA(SEQ ID NO:7)或其保守取代的变体;IDWGDGGX,其中X是A或T(SEQ ID NO:8)或其保守取代的变体;以及AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:9)或其保守取代的变体。在一个实施方案中,RB中的CDR2序列是IDWGDGGA(SEQ ID NO:10)。

[0010] 在一个实施方案中,RB实质上由或由以下组成:QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNKGTMYLMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:11)或其保守取代的变体。在另一个实施方案中,RB实质上由或由以下组成:QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:12)或其保守取代的变体。在一个实施方案中,RB实质上由或由抗体的重链可变区的氨基酸序列组成,该抗体与由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12组成的sdAb交叉竞争结合至

hIGF1R。

[0011] 在一些实施方案中,融合蛋白质中的货物部分包含在溶酶体贮积症(LSD)中缺乏的酶的氨基酸序列,实质上由或由该氨基酸序列组成,该酶例如 α -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、芳基硫酸酯酶B(ARSB)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)、葡萄糖神经酰胺酶(GBA)、 α -半乳糖苷酶A(GLA)和 α -1,4-葡萄糖苷酶(GAA)。在一个实施方案中,货物部分不是IDS。在其它实施方案中,货物部分(分子)包含结合至脑中的靶蛋白质(例如, β -分泌酶1(BACE1)、免疫疗法靶标(例如,程序性死亡受体1(PD-1))的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列,实质上由或由该氨基酸序列组成。

[0012] 本公开的BBB转运融合蛋白质中的L1和L2氨基酸序列可相同或不同。在一些实施方案中,L1和L2中的每一者的长度为3至约35个氨基酸、4至约30个氨基酸,或5至约20个氨基酸。在一个实施方案中,L1和L2中的每一者实质上由或由(GGGGS)_n(SEQ ID NO:13)组成,其中n等于3、4或5。在一个实施方案中,L1和L2中的每一者实质上由或由(GGGGS)₄(SEQ ID NO:14)组成。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质中的货物部分是IDUA蛋白质。在一个实施方案中,BBB转运IDUA融合蛋白质包含图6中所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:38),实质上由或由该氨基酸序列组成。

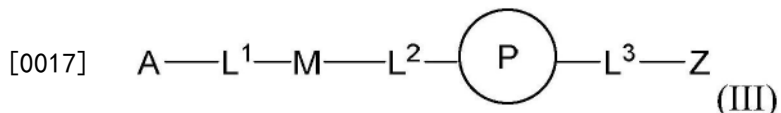
[0013] 在另一个方面,本公开提供了一种多核苷酸(例如,分离的多核苷酸),其包含编码本文所述的BBB转运融合蛋白质的核苷酸序列。在一个实施方案中,核苷酸序列可操作地连接至启动子序列和polyA信号序列。在一个实施方案中,该启动子序列与图4中的启动子序列(SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34)中的一个启动子序列是同一的或基本上同一的。在一个实施方案中,该polyA信号序列与图5中所示的polyA信号序列(SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37)中的一个polyA信号序列是同一的或基本上同一的。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质由图6中所示的氨基酸序列组成,并且该多核苷酸包含图7中所示的核苷酸序列,实质上由或由该核苷酸序列组成。

[0014] 在又一个方面,本公开提供了一种被遗传修饰成表达并分泌本文所述的BBB转运融合蛋白质的哺乳动物细胞(例如,小鼠细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、猴细胞、人类细胞(例如,RPE细胞)。在一个实施方案中,通过用本文所述的编码BBB转运融合蛋白质的多核苷酸(例如,表达载体)转染来对该哺乳动物细胞进行遗传修饰。在一个实施方案中,该融合蛋白质中的货物部分是IDUA蛋白质。在一个实施方案中,通过用包含图7中所示的核苷酸序列的表达载体转染来从ARPE-19细胞衍生出该哺乳动物细胞。

[0015] 本公开还提供了一种包含多个本文所述的经遗传修饰的细胞的组合物以及制造该组合物的方法。在一个实施例中,该组合物包含细胞培养基或贮存介质。在一个实施方案中,该组合物包含其中悬浮有细胞的聚合物溶液,例如本文所述的聚合物溶液,例如包含藻酸盐和例如如本文所定义的细胞结合物质的聚合物溶液。在一个实施方案中,制造该组合物的方法包括培养多个本文所述的经遗传修饰的细胞,直到已经产生所需数目的经培养细胞,以及将所需数目的经培养细胞与细胞培养基、贮存介质或聚合物溶液组合。

[0016] 在又一个方面,本公开的特征是一种设备,该设备包括至少一个含细胞隔室,该含细胞隔室包含如本文所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞或多个此类细胞。该设备被构造成保护一个或多个细胞免受接受者的免疫系统的影响并减轻对植入的设备的异物反应(FBR)(如本文所定义)。在一个实施方案中,设备的表面包含减轻对设备的FBR(如本文所定义)的

化合物或聚合物(例如,去纤维化(afibrotic)化合物或去纤维化聚合物)。在一个实施方案中,去纤维化聚合物包括生物相容性两性离子聚合物,例如,如WO 2017/218507、WO 2018/140834或Liu等人,Zwitterionically modified alginates mitigate cellular overgrowth for cell encapsulation,Nature Communications(2019)10:5262中所描述。在一个实施方案中,该化合物为式(III)化合物:



[0018] 或其药学上可接受的盐,其中变量A、 L^1 、M、 L^2 、P、 L^3 和Z以及相关子变量在本文中被定义。在一些实施方案中,式(III)化合物或其药学上可接受的盐(例如,式(III-a)、(III-b)、(III-b-i)、(III-b-ii)、(III-c)、(III-d)、(III-e)、(III-f)、(IV)、(IV-a)、(V)、(V-a)、(V-b)、(V-c)、(V-d)、(VI-a)、(VI-b)、(VI-c)、(VI-d)或(VI-e))是本文所述的化合物,包括例如本文表6中所示的化合物之一。在一个实施方案中,式(III)化合物为选自表6中所示的化合物100、化合物101、化合物102或化合物122的化合物。

[0019] 在一个方面,本公开的设备是两隔室水凝胶胶囊(例如,微胶囊(直径小于1mm)或毫米胶囊(直径为至少1mm)),其中包含多个活的本文所述的经遗传修饰的细胞(以及任选的一种或多种细胞结合物质)的含细胞隔室(例如,内隔室)被包含去纤维化聚合物的屏障隔室(例如,外隔室,例如水凝胶层)包围。在一个实施方案中,去纤维化聚合物包含去纤维化化合物。在一个实施方案中,去纤维化化合物为式(III)化合物。

[0020] 在另一个方面,本公开的特征是一种包含多个(至少3、6、12、25、50个或更多个中的任一个)本文所述的含细胞设备的制剂(例如,组合物),例如,包封经遗传修饰的ARPE-19细胞的水凝胶胶囊的制剂。在一些实施方案中,该制剂是药学上可接受的组合物。

[0021] 在另一个方面,本公开的特征是一种制备或制造包含本文所述的经遗传修饰的细胞的设备的方法。在一些实施方案中,该方法包括提供经遗传修饰的细胞或多个此类细胞,以及将一个或多个细胞设置于封闭部件(例如,如本文所述的设备的含细胞隔室)中。在一些实施方案中,封闭部件包括柔性聚合物(例如,PLA、PLG、PEG、CMC或多糖,例如藻酸盐)。在一些实施方案中,封闭部件包括非柔性聚合物或金属外壳。在一些实施方案中,设备的表面例如用如本文所述的式(III)化合物进行化学修饰。

[0022] 在一个实施方案中,将本文所述的设备或多个该设备与药学上可接受的赋形剂组合以制备设备制剂或组合物,该设备制剂或组合物可施用于需要用由该设备产生的BBB转运融合蛋白质治疗的受试者(例如,施用至腹膜内腔中)。在一个实施方案中,经遗传修饰的细胞衍生自人类细胞(例如,RPE细胞、ARPE-19细胞),并且该设备制剂或组合物能够在持续的时间段(例如,至少以下中的任一者:3个月、6个月、1年、2年或更长时间)内向受试者连续递送有效量的BBB转运融合蛋白质。

[0023] 在另一个方面,本公开的特征是一种评价本文所述的组合物、设备或设备制剂的方法。在一些实施方案中,该方法包括提供组合物、设备或设备制剂以及评价该组合物、设备或设备制剂的功能参数。在一个实施方案中,功能参数是由体外(例如,当放置于合适的培养基中时)和/或体内(例如,在植入到受试者,例如非人类受试者或人类受试者中之后)的组合物、设备或设备制剂中的细胞产生的BBB转运融合蛋白质的量。

[0024] 在另一个方面,本公开的特征是一种治疗需要使用本文所述的BBB转运融合蛋白质的疗法的受试者的方法。在一个实施方案中,该方法包括向该受试者施用可植入元件(例如,设备或设备制剂),该可植入元件包含表达并分泌该融合蛋白质的经遗传修饰的细胞,或多个此类细胞。在一些实施方案中,施用步骤包括将药学上可接受的制剂放置于受试者中,该制剂包含多个设备,这些设备中的每个设备均具有产生BBB转运融合蛋白质的能力。在一些实施方案中,将可植入元件施用至、置于或注射于受试者的腹膜腔(例如,小囊)、网膜或皮下脂肪中。在一个实施方案中,该方法进一步包括测量从受试者移除的组织样品中(例如从血液样品分离的血浆中或从CNS或目标器官获得的组织样品中)存在的BBB转运融合蛋白质的量。在一个实施方案中,在施用、植入或放置设备或设备制剂后15、30、60或120天从患者移除组织样品。在一些实施方案中,受试者是人。在一个实施方案中,受试者是被诊断为患有神经元病性MPS疾病的人患者,并且融合蛋白质包含在神经元病性MPS疾病中缺乏的糖胺聚糖代谢酶。在一个实施方案中,可植入元件产生足以减少神经元病性MPS疾病的一种或多种症状的量的BBB转运融合蛋白质。在一个实施方案中,该治疗使得脑中以及任选的位于CNS外的一种或多种其它器官或组织(例如肝、脾、肾、肺和心脏)中的硫酸乙酰肝素水平降低。在一个实施方案中,患者已被诊断患有I型粘多糖贮积症(MPS I),并且BBB转运融合蛋白质包含人IDUA蛋白质。

[0025] 本文阐述了本公开的一个或多个实施方案的细节。本公开的其它特征、目标和优点将从具体实施方式、附图、实施例和权利要求书中显而易见。

附图说明

[0026] 图1A-1J示出可作为货物多肽包含在本文所述的BBB转运融合蛋白质中的示例性LSD酶的野生型人前体多肽的氨基酸序列:GAA(图1A,SEQ ID NO:15);GBA(图1B,SEQ ID NO:16);GLA(图1C,SEQ ID NO:17);GNS(图1D,SEQ ID NO:18);GUSB(图1E,SEQ ID NO:19);HGSNAT(图1F,SEQ ID NO:20);IDS(图1G,SEQ ID NO:21);IDUA(图1H,SEQ ID NO:22);NAGLU(图1I,SEQ ID NO:23);以及SGSH(图1J,SEQ ID NO:24)。

[0027] 图2A-2B示出本文所述的BBB转运融合蛋白质所结合的人蛋白质的前体形式的示例性氨基酸序列,其中图2A(SEQ ID NO:25)示出前体人IGF1R单体(UniProtKB-P08069)的氨基酸序列,其中信号肽为斜体,弗林蛋白酶裂解位点以小写字母斜体示出,并且加下划线的粗体字体指示作为本文所述的某些hIGF1R结合结构域的推定结合位点中的接触点的氨基酸,而图2B(SEQ ID NO:95)示出前体人血清白蛋白的氨基酸序列,其中信号肽加下划线。

[0028] 图3A-3F示出本公开的示例性BBB转运IDUA融合蛋白质的氨基酸序列,其中图3A(SEQ ID NO:26)、图3B(SEQ ID NO:27)和图3C(SEQ ID NO:28)中的融合蛋白质包含亲本抗HSA和三个不同的亲本抗IGF1R sdAb序列之一;图3D(SEQ ID NO:29)、图3E(SEQ ID NO:30)和图3F(SEQ ID NO:31)中的融合蛋白质包含图3A、3B和3C中所示的抗HSA和抗IGF1R sdAb序列的人源化变体;并且这些融合蛋白质中的每一种均包含两个具有GGGGS(SEQ ID NO:92)的4或5个重复序列的接头序列。

[0029] 图4A-4C示出可用于本公开的BBB转运融合蛋白质的表达构建体中的示例性启动子序列:pCAG启动子序列(图4A,SEQ ID NO:32);EF1 α 启动子序列(图4B,SEQ ID NO:33);和EFS启动子序列(图4C,SEQ ID NO:34)。

[0030] 图5A-5C示出可用于本公开的BBB转运融合蛋白质的表达构建体中的示例性polyA信号序列:rBG poly A信号序列(图5A,SEQ ID NO:35);SV40晚期poly A信号序列(图5B,SEQ ID NO:36)和BGH poly A信号序列(图5C,SEQ ID NO:37)。

[0031] 图6示出示例性BBB转运IDUA融合蛋白质的氨基酸序列(SEQ ID NO:38),其中加下划线指示VHH共有信号肽,粗体字体指示抗HSA sdAb,斜体表示抗IGF1R sdAb,粗体斜体指示野生型人成熟IDUA氨基酸序列,并且点划线下划线指示柔性接头序列。

[0032] 图7示出可用于表达图6中所述的IDUA融合蛋白质的示例性转录单元的核苷酸序列(SEQ ID NO:39),其中波浪线下划线指示EF1A启动子序列,直线下划线指示VHH共有信号肽的示例性编码序列,粗体字体指示抗HSA sdAb的示例性编码序列,斜体指示抗IGF1RsdAb的示例性编码序列,粗体斜体指示野生型人成熟IDUA氨基酸序列的示例性编码序列,虚线下划线指示柔性接头序列的编码序列,虚线下划线指示终止密码子,并且加下划线的斜体字体指示rBG poly A信号序列。

[0033] 图8A-8B图示了含有经由氨基酸接头与hIDUA融合的示例性抗IGF1R sdAb的单一IDUA融合蛋白质中的IDUA活性,其中图8A示出在表达基于sdAb取向和接头长度的六种不同融合构建体之一的细胞在培养基中的体外IDUA活性,并且图8B比较了来自植入了表达野生型hIDUA(浅灰色条形)或在图8A中产生最高体外hIDUA活性的融合构建体(IGF1rR-hIDUA,深灰色条形)的经包封的细胞的小鼠的肝和血浆样品中的体内hIDUA活性。

[0034] 图9A是示出表达含有各种取向的hIDUA、示例性抗IGF1R sdAb(IGF1R5)和示例性抗HSA sdAb(R28)的六种不同的双重IDUA融合蛋白质之一的细胞在条件培养基中的体外IDUA活性的图表。

[0035] 图9B是比较表达示例性抗IGF1R-hIDUA融合酶(IGF1R4-hIDUA,浅灰色条形)的细胞与表达示例性抗HSA-抗IGF1R-hIDUA融合酶(R28-IGF1R5-hIDUA,深灰色条形)的细胞在条件培养基中的体外IDUA活性的图表。

[0036] 图10是比较植入了表达野生型hIDUA(浅灰色条形)或示例性抗HSA-抗IGF1R-hIDUA融合酶(R28-IGF1R5-hIDUA,深灰色条形)的经包封的细胞的小鼠的血浆和全身(非脑)组织中的体内hIDUA活性的图表。

[0037] 图11是比较来自未经治疗的MPS-1小鼠(浅灰色条形)和植入了表达示例性抗HSA-抗IGF1R-hIDUA融合酶(R28-IGF1R5-hIDUA,深灰色条形)的经包封的细胞的小鼠的脑组织样品中的硫酸乙酰肝素水平的图表。

[0038] 图12A和12B是本公开的示例性BBB转运IDS融合蛋白质的氨基酸序列(SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:94)。

[0039] 图13是图示了如实施例5中概述的用本文所述的示例性构建体产生的酶活性水平的比较的图表。

[0040] 图14是比较来自未经治疗的MPS-1小鼠(灰色条形)和植入了表达示例性抗HSA-抗IGF1R-hIDUA融合酶(R28-IGF1R5-hIDUA,黑色条形)的经包封的细胞的小鼠的肝、脾、肾、肺和心脏组织样品中的硫酸乙酰肝素水平的图表。

[0041] 图15是比较来自未经治疗的MPS-1小鼠(实心黑色条形)和植入了表达示例性hIDUA融合酶(灰色条形)的经包封的细胞的小鼠的脑组织样品中的硫酸乙酰肝素水平的图表。

具体实施方式

[0042] 本公开的特征是包含HSA和hIGF1R结合结构域和货物部分的BBB转运融合蛋白质,被遗传修饰成表达并分泌这些融合蛋白质的哺乳动物细胞(例如,人RPE细胞),以及包含经遗传修饰的细胞的组合物和设备。在一些实施方案中,设备包括含细胞隔室,该含细胞隔室包括细胞结合物质以及经遗传修饰的细胞。在一些实施方案中,设备被构造为当被放置在受试者(例如,人受试者)中时减轻FBR。在一些实施方案中,融合蛋白质、经遗传修饰的细胞、组合物和设备可用于治疗CNS疾患或病症,诸如溶酶体贮积病。各种实施方案将在下文中进行描述。

[0043] 缩写和定义

[0044] 在本公开的整个详细描述和实施例,将使用以下缩写。

[0045]	CNS	中枢神经系统
[0046]	CS	硫酸软骨素
[0047]	DS	硫酸皮肤素
[0048]	GAA	酸性 α -葡萄糖苷酶
[0049]	GAG	糖胺聚糖
[0050]	GBA	β -葡萄糖苷酶
[0051]	GLA	α -半乳糖苷酶A
[0052]	GNS	N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶
[0053]	GUSB	β -葡萄糖苷酸酶(glucuronidase)
[0054]	HS	硫酸乙酰肝素
[0055]	HGSNAT	乙酰肝素- α -氨基葡萄糖苷N-乙酰转移酶蛋白质
[0056]	IDS	艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶蛋白质
[0057]	IDUA	α -L-艾杜糖醛酸酶蛋白质
[0058]	MPS	粘多糖贮积症
[0059]	NAGLU	α -N-乙酰基-氨基葡萄糖苷酶
[0060]	SGSH	N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶

[0061] 为了可以更容易地理解本公开,下文具体地定义本文中使用的某些技术和科学术语。除非在本文件的别处具体定义,否则本文使用的所有其它技术和科学术语具有本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

[0062] 除非上下文另有明确规定,否则如本文(包括所附权利要求书)所用,单数形式的词如“一个/种(a/an)”和“该/所述(the)”包括其相应的复数指代物。

[0063] “约”或“大约”,当在本文中被用于修饰从数字定义的参数(例如,由工程化细胞分泌的融合蛋白质的量,设备(例如,水凝胶胶囊)的物理描述如直径、球形度、包封在其中的细胞的数目、制剂中的设备的数目)时,意指所列举的数值在由本领域普通技术人员确定的所定义参数的可接受的功能范围内,这将部分取决于如何测量或确定该数值,例如测量系统的限制,包括该测量系统的可接受误差范围。例如,“约”可意指所列举数值以上和以下20%的范围。作为非限制性实例,被定义为具有约1.5毫米(mm)的直径并包封约5百万(M)个细胞的水凝胶胶囊可具有1.2至1.8mm的直径并且可包封4M至6M个细胞。作为另一个非限制性实例,约100个设备(例如,水凝胶胶囊)的制剂包括具有80至120个设备的制剂。在一些实

施方案中,术语“约”意指所修饰的参数可在该参数的所陈述数值以上和以下变化多达15%、10%或5%。

[0064] 如本文所用的术语“获得(acquire)”或“获得(acquiring)”是指通过“直接获得”或“间接获得”值(例如,数值)或物理实体(例如,样品)来获得该值或图像或该物理实体的过程。“直接获得”意指执行一个过程(例如,执行分析方法或方案)来获得值或物理实体。“间接获得”是指从另一方或来源(例如,直接获得物理实体或值的第三方实验室)接收该值或物理实体。直接获得值或物理实体包括执行包括物理物质的物理变化或机器或设备的使用的过程。直接获得值的实例包括从人受试者获得样品。直接获得值包括执行使用机器或设备的过程,例如使用荧光显微镜来获得荧光显微术数据。

[0065] 如本文所用的“施用(Administer)”、“施用(administering)”或“施用(administration)”是指将本文所述的实体(例如,设备或设备的制剂)植入、吸收、摄取、注射、放置或以其它方式引入到受试者中,或向受试者提供这样的实体以供施用。

[0066] 如本文所用的“去纤维化”是指减轻异物反应(FBR)的化合物或材料。例如,通过将包含去纤维化化合物的设备(例如,水凝胶胶囊)(例如,包含用表6中列出的化合物共价修饰的聚合物的水凝胶胶囊)植入到生物组织中而诱导的该组织中的FBR的量低于通过植入没有去纤维化(afibrotic-null)的参考设备,即缺乏任何去纤维化化合物但具有基本上相同的组成(例如,一种或多种相同的细胞类型)和结构(例如,尺寸、形状、隔室数目)的设备所诱导的FBR。在一个实施方案中,使用例如如WO 2017/075630中所描述的本领域中已知的测定或使用Vegas,A.等人,Nature Biotechnol(上文)中描述的测定/方法中的一种或多种测定/方法(例如,所植入胶囊的皮下组织蛋白酶测量,马森氏三色染色(MT),组织切片的苏木精或伊红染色,胶原密度的定量,巨噬细胞(CD68或F4/80)、肌成纤维细胞(α -肌肉肌动蛋白,SMA)或一般细胞沉积的细胞染色和共聚焦显微术,已知炎症因子和免疫细胞标志物的79个RNA序列的定量,或对在合适的测试受试者(例如具有免疫能力的小鼠)的腹膜内间隙中14天后取回的设备(例如,胶囊)上的巨噬细胞和嗜中性粒细胞的FACS分析)通过含有所植入的设备(例如,水凝胶胶囊)的组织中的免疫反应来评估FBR的程度,该免疫反应可包括例如蛋白质吸附、巨噬细胞、多核异物巨细胞、成纤维细胞和血管生成。在一个实施方案中,通过测量含有植入物的组织中的一种或多种免疫反应生物标志物(例如组织蛋白酶、TNF- α 、IL-13、IL-6、G-CSF、GM-CSF、IL-4、CCL2或CCL4)的水平来评估FBR。在一些实施方案中,由本发明的设备(例如,包含设置在其外表面上的去纤维化化合物的水凝胶胶囊)诱导的FBR比没有FBR的参考设备,例如除了缺乏用于减轻FBR的装置外与测试或要求保护的设备基本上同一的设备(例如,不包含去纤维化化合物但在其它方面与要求保护的胶囊基本上同一的水凝胶胶囊)诱导的FBR低至少约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%。在一些实施方案中,FBR(例如,一种或多种生物标志物的水平)是在约30分钟、约1小时、约6小时、约12小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约1周、约2周、约1个月、约2个月、约3个月、约6个月或更长时间后测量。

[0067] “酸性 α -葡萄糖苷酶蛋白质”、“酸性麦芽糖酶蛋白质”、“ α -1,4-葡萄糖苷酶蛋白质”和“GAA蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指包含由野生型哺乳动物(例如人)GAA基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的GAA活性测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟GAA蛋白质的80% -

120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的GAA酶活性。GAA酶催化糖原中 $\alpha(1,4)$ 和 $\alpha(1,6)$ 键联的水解,从而产生游离葡萄糖和缩短的糖原聚合物。GAA酶活性可使用任何本领域公认的测定来测量。野生型人GAA基因编码952个氨基酸的前体多肽原,其中的N末端27个氨基酸构成信号肽,并且氨基酸28-69构成肽原(UniProtKB-P10253)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的GAA氨基酸序列包含图1A中所示的人前体GAA序列的氨基酸70-952。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质中的人GAA氨基酸序列实质上由图1A中所示的序列的氨基酸28-952组成。

[0068] “ α -半乳糖苷酶A蛋白质”、“ α -Gal A蛋白质”和“GLA蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指包含由野生型哺乳动物(例如人)GLA基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的GLA活性测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟GLA蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的GLA酶活性。GLA酶水解鞘糖脂,特别是神经酰胺三己糖苷(Gb_3)中的末端 α -D-半乳糖残基。GLA酶活性可使用任何本领域公认的测定来测量。野生型人GLA基因编码429个氨基酸的多肽,其中的N末端31个氨基酸构成信号肽(UniProtKB-P06280)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的人GLA氨基酸序列实质上由图1C中所示的人前体GLA氨基酸序列的氨基酸32-429组成。

[0069] “ α -L-艾杜糖醛酸酶蛋白质”和“IDUA蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指包含由野生型哺乳动物(例如,人)IDUA基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认>IDUA活性测定(例如,底物4-甲基伞形酮基- α -L-艾杜糖醛酸苷(4MU-艾杜糖醛酸苷)的水解,参见例如Ou, L.等人, Mol Genet Metab. 2014年2月:111(2):113-115)或本文所述的任何IDUA活性测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟IDUA蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的IDUA酶活性。IDUA蛋白质使糖胺聚糖(GAG)(例如硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素)中的非还原末端 α -L-艾杜糖醛酸残基水解。人野生型IDUA基因编码653个氨基酸的前体蛋白质,其中的N末端26或27个氨基酸构成信号肽(GenBank登录号AAA81589.1, GenBank登录号AAA51698.1; UniProtKB-P35475)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人IDUA氨基酸序列包含图1H中所示的前体人IDUA氨基酸序列的氨基酸26、27或28至氨基酸653。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质中的成熟人IDUA氨基酸序列实质上由图1H中所示的氨基酸序列的氨基酸27-653组成。

[0070] “ α -N-乙酰基-氨基葡萄糖苷酶蛋白质”、“N-乙酰基- α -氨基葡萄糖苷酶”和“NAGLU蛋白质”在本文中可互换地用来指包含由野生型哺乳动物(例如人)NAGLU基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的NAGLU测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟NAGLU蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的酶活性。NAGLU催化N-乙酰基- α -D-氨基葡萄糖苷中的末端非还原N-乙酰基-D-葡萄糖胺残基的水解。野生型人NAGLU基因编码743个氨基酸的前体多肽,其中的N末端23个氨基酸构成信号肽(UniProtKB-P54802)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人NAGLU氨基酸序列实质上由图1I中所示的氨基酸序列的氨基酸24-743组成。

[0071] “ β -葡萄糖醛酸酶蛋白质”和“GUSB蛋白质”在本文中可互换地用来指包含由野生型

哺乳动物(例如人)GUSB基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的GUSB测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟GUSB蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的酶活性。GUSB催化 β -D-葡萄糖醛酸苷(glucuronoside)水解为醇和D-葡萄糖醛酸。野生型人GUSB基因编码651个氨基酸的前体多肽,其中的N末端22个氨基酸构成信号肽(UniProtKB P08236)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人GUSB氨基酸序列实质上由图1E中所示的序列的氨基酸23-651组成。

[0072] “ β -葡萄糖苷酶蛋白质”、“酸性 β -葡萄糖脑苷脂酶蛋白质”、“葡萄糖脑苷脂酶蛋白质”、“葡萄糖神经酰胺酶蛋白质”、“溶酶体酸性葡萄糖基神经酰胺酶蛋白质”、“溶酶体酸性GCase蛋白质”和“GBA蛋白质”在本文中可互换地用来指包含由野生型哺乳动物(例如人)GBA基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的GBA测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟GBA蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的酶活性。溶酶体隔室内的GBA催化糖脂葡萄糖神经酰胺(GlcCer)分解为神经酰胺和葡萄糖。野生型人GBA基因编码536个氨基酸的前体多肽,其中的N末端39个氨基酸构成信号肽(UniProtKB P04062.3)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人GBA氨基酸序列实质上由图1B中所示的序列的氨基酸40-536组成。

[0073] 如本文所用的“细胞”是指工程化的细胞(例如,经遗传修饰的细胞)或未工程化的细胞。在一个实施方案中,细胞是永生化细胞或衍生自永生化细胞的工程化细胞。在一个实施方案中,细胞是活细胞,例如,如通过本文所述或本领域已知的任何技术所测量是有活力的。

[0074] 如本文所用的“细胞结合肽(CBP)”意指包含衍生自细胞粘附分子(CAM)(例如,介导细胞-基质连接或细胞-细胞连接的细胞粘附分子)的配体的细胞结合结构域的氨基酸序列的线性或环状肽。在一个实施方案中,CBP是国际专利公布W02020069429中描述的任何CBP。在一个实施方案中,CBP是包含RGD(SEQ ID NO:87)的线性肽并且长度小于10个氨基酸。在一个实施方案中,CBP是实质上由GRGD(SEQ ID NO:88)或GRGDSP(SEQ ID NO:89)组成的线性肽。

[0075] 如本文所用的“CBP-聚合物”意指包含经由接头共价附接至聚合物的至少一种细胞结合肽分子的聚合物。在一个实施方案中,CBP-聚合物中的聚合物是合成的或天然存在的多糖,例如藻酸盐,例如藻酸钠。在一个实施方案中,接头是氨基酸接头(即,实质上由单个氨基酸,或若干同一或不同的氨基酸的肽组成),该接头经由肽键联接至CBP的N末端或C末端。在一个实施方案中,CBP-聚合物是W02020069429中定义的任何CBP-藻酸盐。

[0076] 如本文所用,“细胞结合物质(CBS)”是指能够模拟介导细胞-基质连接或细胞-细胞连接或其它受体介导的信号传导的细胞粘附分子(CAM)或其它细胞表面分子的配体的至少一种活性的任何化学、生物或其它类型的物质(例如,小有机化合物、肽、多肽)。在一个实施方案中,当存在于包封活细胞的聚合物组合物中时,CBS能够与一种或多种细胞形成暂时或永久的键或接触。在一个实施方案中,CBS促进包封在聚合物组合物中的两个或更多个活细胞之间的相互作用。在一个实施方案中,包封多个细胞(例如,活细胞)的聚合物组合物中CBS的存在与在将包封的细胞植入测试受试者(例如小鼠)中时增加的细胞生产力(例如,治

疗剂的表达)和增加的细胞活力中的一者或两者相关。在一个实施方案中,CBS物理附接至聚合物组合物中的一个或多个聚合物分子。在一个实施方案中,CBS是如本文或W02020069429中所定义的细胞结合肽。

[0077] 如本文所用的“经保守修饰的变体”或“保守取代”是指除了在氨基酸序列中具有一个或多个保守氨基酸取代之外,与参考分子同一的参考肽或多肽的变体。在一个实施方案中,经保守修饰的变体由与参考氨基酸序列至少70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,HSA结合结构域序列和/或IGF1R结合结构域序列的经保守修饰的变体不包含CDR中任何氨基酸的取代。保守氨基酸取代是指将氨基酸用具有相似特征(例如,电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)且对所得的经取代的肽或多肽的生物活性的影响最小的氨基酸取代。功能上相似的氨基酸的保守取代代表是本领域众所周知的,并且按功能特征分组的示例性取代列于下表1中。

[0078] 表1. 示例性保守氨基酸取代基团。

特征	保守氨基
电荷/极性	His、Arg、Lys
	Asp、Glu
	Cys、Thr、Ser、Gly、Asn、Gln、Tyr
	Ala、Pro、Met、Leu、Ile、Val、Phe、Trp
疏水性	Asp、Glu、Asn、Gln、Arg、Lys
	Cys、Ser、Thr、Pro、Gly、His、Tyr
	Ala、Met、Ile、Leu、Val、Phe、Trp
结构/表面暴露	Asp、Glu、Asn、Aln、His、Arg、Lys
	Cys、Ser、Tyr、Pro、Ala、Gly、Trp、Tyr
	Met、Ile、Leu、Val、Phe
二级结构倾向	Ala、Glu、Aln、His、Lys、Met、Leu、Arg
	Cys、Thr、Ile、Val、Phe、Tyr、Trp
	Ser、Gly、Pro、Asp、Asn
进化保守性	Asp、Glu
	His、Lys、Arg
	Asn、Gln
	Ser、Thr
	Leu、Ile、Val
	Phe、Tyr、Trp
	Ala、Gly
	Met、Cys

[0080] 如整个说明书和权利要求书中所用的“实质上由……组成(Consists essentially of)”以及诸如“实质上由……组成(consist essentially of)”或“实质上由……组成(consisting essentially of)”的变化形式表示包括任何列举的要素或要素的组,并且任选地包括与所列举的要素具有相似或不同性质的其它要素,该其它要素不会实质上改变指定分子、组合物、设备或方法的基本或新颖特性。作为非限制性实例,实质上由所列举的氨基酸序列组成的HSA结合结构域或IGF1R结合结构域还可分别包含不实质上影响HSA结合结构域或IGF1R结合结构域的相关生物活性的一个或多个氨基酸(包括所列举的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基的取代)。

[0081] 如本文关于一个或多个细胞所用的“衍生自”是指从组织、细胞系或细胞获得的细胞,该细胞然后任选地被培养、传代、永生化、分化和/或诱导等以产生一个或多个衍生的细胞。

[0082] 如本文中使用的“设备”是指任何可植入物体(例如,颗粒、水凝胶胶囊、植入物、医疗设备),该可植入物体含有能够在植入设备后表达和分泌融合蛋白质的一个或多个工程化细胞(例如,活细胞),并且具有通过允许细胞营养物质进入设备来支持该细胞的活力的构造。

[0083] 如本文使用的“有效量”是指以下中的任一者的量:分泌BBB转运融合蛋白质的经遗传修饰的细胞、产生融合蛋白质的设备制剂、设备中的经遗传修饰的细胞的数目、设备中足以引起所需生物反应的CBS和/或去纤维化化合物的量。在一些实施方案中,术语“有效量”是指设备的部件的量(例如,设备中的细胞的数目、设置在设备的表面上和/或屏障隔室中的去纤维化化合物的密度、含细胞隔室中的CBS的密度)。

[0084] 在一个实施方案中,所需的生物反应是从用经遗传修饰的细胞、含有此类细胞的设备或设备制剂治疗(例如,植入了经遗传修饰的细胞、含有此类细胞的设备或设备制剂)的受试者移除的组织样品中货物分子(例如,货物多肽)的水平增加。如本领域的普通技术人员将理解的,有效量可以根据诸如以下的因素变化:所期望的生物学终点,分泌的BBB转运融合蛋白质、组合物或设备的药物代谢动力学,所治疗的疾患,施用方式,以及受试者的年龄和健康状况。有效量涵盖治疗性和预防性治疗。

[0085] 在一个实施方案中,设置在设备之上或之中的式(III)化合物的有效量是与参考设备相比减少对所植入的设备的FBR的量,例如减少所植入的设备上或附近的纤维变性或纤维化组织的量。

[0086] 在一个实施方案中,在含细胞隔室中与工程化细胞一起设置的CBS的有效量是与参考设备相比增强该细胞的活力(例如,活细胞的数目)和/或与参考设备相比增加该细胞的BBB转运融合蛋白质的产生(例如,增加植入有该设备的受试者的血浆中融合蛋白质的水平)的量。设备、组合物或组分(例如,去纤维化化合物、CBS、工程化细胞)的有效量可通过本文所述的领域中已知的任何技术来确定。

[0087] 如本文所用的“工程化细胞”或“经遗传修饰的细胞”是具有非天然发生的改变的哺乳动物细胞(例如人细胞,例如RPE细胞、衍生自细胞系(例如ARPE-19或其它细胞系)的细胞、干细胞、由iPSC分化的细胞),并且通常包含编码本文所述的BBB转运融合蛋白质的外源核苷酸序列(例如,载体或改变的染色体序列)。在一个实施方案中,外源核苷酸序列是染色体的(例如,外源序列设置于内源染色体序列中)或染色体外的(例如,非整合的表达载体)。在一个实施方案中,经遗传修饰的细胞中的外源核苷酸序列包含针对AB、BBB或C结构域中的一者、两者或全部三者的经密码子优化的编码序列,该经密码子优化的编码序列实现比这些结构域中的每一个结构域的天然存在的编码序列更高的融合蛋白质表达。经密码子优化的序列可使用市售算法,例如GeneOptimizer(ThermoFisher Scientific)、OptimumGeneTM(GenScript,Piscataway,NJ USA)、GeneGPS®(ATUM,Newark,CA USA)或Java Codon Adaptation Tool(JCat,www.jcat.de,Grote,A.等人,Nucleic Acids Research,第33卷,增刊第2期,第W526-W531页(2005)产生。在一个实施方案中,该细胞还被遗传修饰,以减少或消除由亲本细胞天然表达的一种或多种蛋白质的表达。在一个实施

方案中,从经稳定转染的细胞群体或单克隆细胞系培养经遗传修饰的细胞(例如,经修饰的RPE细胞、经修饰的ARPE-19细胞)。

[0088] 如本文所用的“外源核苷酸序列”是不天然存在于受试者细胞中的核苷酸序列。

[0089] 如本文所用的“外源多肽”是不天然存在于受试者细胞(例如,工程化细胞)中的多肽。提及特定序列的氨基酸位置是指所述氨基酸在参考氨基酸序列,例如全长成熟(信号肽裂解后)野生型蛋白质的序列(除非另有说明)中的位置,并且不排除参考氨基酸序列中其它位置处的变异(例如缺失、插入和/或取代)的存在。

[0090] 如本文所用的“表达载体”是指包含一个或多个表达构建体的重组多核苷酸,该表达构建体编码一种或多种待表达的蛋白质。每个表达构建体均含有可操作地连接至一个或多个待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的顺式作用的用于表达的元件;其它用于表达的元件可由宿主细胞或在体外表达系统中提供。载体可包含用于将一个或多个表达盒表达和/或整合到哺乳动物细胞的基因组中的额外序列元件。表达载体包括本领域中已知的并入有重组多核苷酸的所有表达载体,诸如粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。适合用于将哺乳动物细胞工程化成表达本文所述的任何融合蛋白质的表达载体还可含有编码用于选择含有此种载体的细胞的标志物的核苷酸序列。合适标志物的实例是编码对抗生素(诸如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、诺尔丝菌素或博来霉素)具有抗性的基因。

[0091] “法布里病(Fabry disease)”、“GLA缺乏症”、“ α -半乳糖苷酶A缺乏症”和“安德森-法布里病(Anderson-Fabry disease)”在本文中可互换地用来指由酶 α -半乳糖苷酶A(GLA或GALA)的活性缺乏引起的X连锁LSD,该缺乏导致鞘糖脂神经酰胺三己糖苷(Gb3)在各种组织和器官中的破坏性累积。已经在患有法布里病的人中鉴定了位于人GLA基因中的超过370种不同的突变,其中许多是单一家族所特有的。消除GLA活性的突变导致严重的经典形式的法布里病,其通常在儿童期开始发病。较轻微、晚发形式的法布里病与降低但不会消除GLA活性的突变有关。法布里病患者是指被诊断患有或疑似患有法布里病的个体。可使用本领域已知的任何方法来诊断法布里病患者。在一个实施方案中,人法布里病患者具有与GLA酶活性缺乏和/或法布里病相关的GLA基因突变。

[0092] 如本文所用的“戈谢病”是指由 β -葡萄糖脑苷脂酶的活性缺乏引起的常染色体隐性LSD,该缺乏导致糖脂葡萄糖脑苷脂在整个身体的细胞内累积。已鉴定出了至少五种形式的戈谢病;与CNS并发症相关的形式被命名为戈谢病2型和戈谢病3型。2型形式也称为急性神经元病性戈谢病,发生在新生儿和婴儿中,他们通常在生命的最初三年内死亡。3型戈谢病也称慢性神经元病性戈谢病,通常发生在生命的最初十年,其中CNS并发症的发生和进展比2型患者更慢。位于GBA基因中的许多突变一直与2型和3型戈谢病有关,其中L483P取代是与3型相关的最常见突变。戈谢病患者是指已被诊断患有或疑似患有戈谢病的个体。在一个实施方案中,人戈谢病患者具有与GBA酶活性缺乏和/或3型戈谢病相关的GBA基因突变。

[0093] “乙酰肝素- α -氨基葡萄糖苷N-乙酰转移酶蛋白质”、“乙酰肝素乙酰基-CoA: α -氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶蛋白质”、“HGSNAT蛋白质”和“N-乙酰转移酶蛋白质”在本文中可互换地用来指包含由野生型哺乳动物(例如人)基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的HGSNAT测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟HGSNAT蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或

95% - 105% 以内的HGSNAT酶活性。HGSNAT催化溶酶体内乙酰肝素或硫酸乙酰肝素的末端葡萄糖胺残基的乙酰化,从而将它转化为NAGLU水解的底物。野生型人HGSNAT基因编码663个氨基酸的多肽,该多肽包含在易位至内质网中后不会被裂解的预测的信号序列(UniProtKB-Q68CP4)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的HGSNAT氨基酸序列实质上由图1F中所示的人HGSNAT序列的氨基酸1-663组成。

[0094] 如本文所用的“高分子量藻酸盐”或“HMW-A1g”意指近似分子量为150kDa-250kDa的藻酸盐。

[0095] “艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶蛋白质”、“IDS蛋白质”、“I2S蛋白质”和“ α -L-艾杜糖醛酸硫酸酯硫酸酯酶蛋白质”“IDS”在本文中可互换使用,是指包含由野生型哺乳动物(例如人)IDS基因或其任何片段、突变体、变体或衍生物编码的成熟氨基酸序列的蛋白质,如通过任何本领域公认的IDS测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟IDS蛋白质的80% - 120%、85% - 115%、90% - 110%或95% - 105%以内的IDS酶活性。IDS水解硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和乙酰肝素的L-艾杜糖醛酸2-硫酸酯单元的2-硫酸基团。野生型人IDS基因编码550个氨基酸的前体多肽原,其中的N末端25个氨基酸构成信号肽,并且其余氨基酸构成多肽原,该多肽原通过去除氨基酸26-33的前肽且然后裂解成由氨基酸34-455和氨基酸456-550形成的两条链而被加工成成熟多肽。(UniProtKB-P22304)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的IDS氨基酸序列包含图1G中所示的人前体IDS序列的氨基酸34-550。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质中的人IDS氨基酸序列实质上由图1G中所示的序列的氨基酸26-550组成。

[0096] 如本文所用的“低分子量藻酸盐”或“LMS-A1g”意指近似分子量<75kDa的藻酸盐。

[0097] 如本文所用的“溶酶体贮积症”和“LSD”是指由酶或其辅助因子的缺乏引起的先天性代谢缺陷,该缺乏导致溶酶体的缺陷功能以及一种或多种糖胺聚糖(GAG)在各种组织和器官中的累积。作为由重复二糖组成的长未支化多糖的GAG包括:硫酸软骨素(CS)、硫酸皮肤素(DS)、硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸角质素(KS)和透明质酸。约70%的LSD是由酶缺陷引起的,而其余的则是由于酶激活因子或相关蛋白质的缺陷所致。已知的LSD包括酶缺乏性LSD和在Pastores等人,Neurol Clin.31(4);1051-1071(2013)的表1和表2中列出的其它LSD。在一个实施方案中,LSD是粘多糖贮积症(MPS)或神经鞘脂贮积症(SP)。

[0098] 如本文所用的“中等分子量藻酸盐”或“MMW-A1g”意指近似分子量为75kDa至150kDa的藻酸盐。

[0099] 如本文所用的“粘多糖贮积症”和“MPS”是指由参与糖胺聚糖代谢的酶的缺乏引起的疾患,该缺乏导致糖胺聚糖片段在溶酶体中累积并且可导致骨、软组织和CNS表现,特别是对于MPS的神经元病性形式。神经元病性MPS中的神经元损伤与未降解的硫酸乙酰肝素(HS)的储存以及次级毒性产物如GM2和GM3神经节苷脂、炎性细胞因子和活性氧类有关。神经元病性MPS包括MPS-1Hurler(MPS-1H)、MPS-2、MPS-3(A-D)和MPS-7。

[0100] “I型粘多糖贮积症”和“MPS1”在本文中可互换地用来指由IDUA酶活性缺乏以及随之发生的GAG(主要是DS和HS)在多个器官和组织的溶酶体内累积而引起的LSD。MPS1患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS1疾病(例如重度MPS1或减弱的MPS1)的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS1的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域已知的任何方法诊断患者。在一个实施方案中,人MPS1患者具有与IDUA酶活性缺乏和/或MPS1疾病相关的位于IDUA

基因中的突变。

[0101] “II型粘多糖贮积症”、“MPS2”和“亨特综合征”在本文中可互换地用来指由IDS酶活性缺乏以及随之发生的GAG (主要是DS和HS) 在多个器官和组织的溶酶体内累积而引起的X连锁LSD。MPS2患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS2疾病,例如严重早发MPS2(症状在2-4岁内变得明显)或轻度、晚发MPS2的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS2的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断在一个实施方案中,人MPS2患者具有与IDS活性缺乏和/或MPS2疾病相关的位于IDS基因中的突变。

[0102] “IIIA型粘多糖贮积症”、“MPS 3A”和“A型圣菲利浦综合征”在本文中可互换地用来指由SGSH活性缺乏以及随之发生的硫酸乙酰肝素在CNS中的累积引起的常染色体隐性LSD。MPS 3A的特征在于重度CNS变性。在MPS 3A患者中已鉴定出了位于SGSH基因中的超过80种不同的突变。MPS 3A患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS3A疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS 3A的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断。在一个实施方案中,人MPS 3A患者具有与SGSH酶活性缺乏和/或MPS 3A疾病相关的SGSH基因突变。

[0103] “IIIB型粘多糖贮积症”、“MPS 3B”和“B型圣菲利浦 (Sanfilippo) 综合征”在本文中可互换地用来指由NAGLU酶活性缺乏以及随之发生的HS在CNS中的累积引起的常染色体隐性LSD。位于人NAGLU基因中的超过100种不同的突变与MPS 3B表型相关。MPS 3B患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS 3B疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS 3B的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断。在一个实施方案中,人MPS 3B患者具有与NAGLU酶活性缺乏和/或MPS 3B疾病相关的NAGLU基因突变。

[0104] “IIIC型粘多糖贮积症”、“MPS 3C”和“C型圣菲利浦综合征”在本文中可互换地用来指由HGSNAT酶活性缺乏以及随之发生的硫酸乙酰肝素在CNS中的累积引起的常染色体隐性LSD。MPS 3C疾病发作通常在10岁之前并且其特征进行性CNS变性。在MPS 3C患者中已鉴定出了位于HGSNAT基因中的超过50种不同的突变。MPS 3C患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS 3C疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS 3C的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断在一个实施方案中,人MPS 3C患者具有与HGSNAT酶活性缺乏和/或MPS 3C疾病相关的HGSNAT基因突变。

[0105] “IIID型粘多糖贮积症”、“MPS 3D”和“D型圣菲利浦综合征”在本文中可互换地用来指由GNS酶活性缺乏以及随之发生的HS在CNS中的累积引起的常染色体隐性LSD。MPS 3D疾病发作通常在2岁与6岁之间并且其特征在于大多数6岁与10岁之间的患者会出现严重神经系统变性。MPS 3D患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS 3D疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS-3A的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断。在一个实施方案中,人MPS 3D患者具有与GNS酶活性缺乏和/或MPS 3D疾病相关的GNS基因突变。

[0106] “VII型粘多糖贮积症”、“MPS7”和“斯赖综合征 (Sly syndrome)”在本文中可互换地用来指由GUSB酶活性缺乏以及随之发生的CS、DS和HS在多种组织的溶酶体中的累积引起的常染色体隐性LSD。在MPS 7患者中已鉴定出了位于GUSB基因中的至少49种不同的突变。MPS 7患者是指已被诊断患有或疑似患有MPS 7疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断MPS 7的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断在

一个实施方案中,人MPS 7患者具有与GUSB酶活性缺乏和/或MPS 7疾病相关的GUSB基因突变。

[0107] “N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶蛋白质”、“葡萄糖胺N-乙酰基-6-硫酸酯酶蛋白质”和“GNS蛋白质”在本文中可互换地用来指包含由野生型哺乳动物(例如人)GNS基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的GNS酶测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟GNS蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的GNS酶活性。GNS催化硫酸乙酰肝素和硫酸角质素的N-乙酰基-D-葡萄糖胺6-硫酸酯单元的6-硫酸酯基团的水解。野生型人GNS基因编码552个氨基酸的前体多肽,其中N的末端36个氨基酸构成信号肽(UniProtKB-P15586)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人GNS氨基酸序列实质上由图1D中所示的人前体GNS序列的氨基酸37-552组成。

[0108] “N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶”、“SGSH”、“磺酰胺酶”和“乙酰肝素-N-硫酸酯酶”在本文中可互换地用来指包含由野生型哺乳动物(例如人)SGSH基因编码的成熟氨基酸序列或其任何片段、突变体、变体或衍生物的蛋白质,如通过任何本领域公认的SGSH测定所测量,该蛋白质具有在相应野生型哺乳动物成熟SGSH蛋白质的80%-120%、85%-115%、90%-110%或95%-105%以内的酶活性。SGSH催化N-磺基-D-葡萄糖胺水解为D-葡萄糖胺和硫酸盐。野生型人SGSH基因编码502个氨基酸的前体多肽,其中的N末端20个氨基酸构成信号肽(UniProtKB-P51688)。在一些实施方案中,本文所述的BBB转运融合蛋白质中的成熟人SGSH氨基酸序列实质上由图1J中所示的序列的氨基酸21-502组成。

[0109] 如本文所用的“肽”是少于50个氨基酸、通常少于25个氨基酸的多肽。

[0110] 如本文所用的“PolyA信号”是指终止编码序列转录成RNA并指导polyA尾添加到RNA上的任何连续序列。polyA信号的实例是兔结合球蛋白(rBG)polyA信号、SV40晚期polyA信号、SV50 polyA信号、牛生长激素(BGH)polyA信号、人生长激素(HGH)polyA信号和本领域已知的合成polyA信号。

[0111] 如本文所用,“聚合物组合物”是包含一种或多种聚合物的组合物(例如,溶液、混合物)。作为一类,“聚合物”包括均聚物、杂聚物、共聚物、嵌段聚合物、嵌段共聚物并且可以是天然的和合成的。均聚物含有一种类型的结构单元或单体,而共聚物含有多于一种类型的单体。

[0112] 如本文所用的“多肽”是包含通过肽键连接的氨基酸残基并且具有至少两个、并且在一些实施方案中至少10、50、75、100、150或200个氨基酸残基的聚合物。

[0113] “庞贝病(Pompe disease,PD)”、“酸性 α -葡萄糖苷酶缺乏症”和“II型糖原贮积症”在本文可互换地用来指由GAA酶活性缺乏和随之发生的溶酶体糖原主要在心脏、骨骼、平滑肌和神经系统中的过量累积引起的常染色体隐性LSD。PD大致分类为婴儿PD(IPD)和晚发PD(LOPD)。在PD患者中已鉴定出了位于GAA基因中的超过580种突变。PD患者是指已被诊断患有或疑似患有PD疾病的个体(例如,人)。可使用包括用于诊断PD的临床、生物化学和遗传方法在内的本领域中已知的任何方法对患者进行诊断在一个实施方案中,人PD患者具有与GAA酶活性缺乏和/或PD相关的GAA基因突变。在一个实施方案中,患者已被诊断患有LOPD。

[0114] 如本文所用的“预防(Prevention)”、“预防(prevent)”和“预防(preventing)”是指一种这样的治疗,该治疗包括在CNS疾患或疾病的一种或多种症状发作之前施用或施加

本文所述的BBB转运融合蛋白质,例如施用包封表达融合蛋白质(例如,如本文所述)的经修饰的细胞的设备组合物,以阻止该一种或多种症状的身体表现。在一些实施方案中,“预防(Prevention)”、“预防(prevent)”和“预防(preventing)”需要CNS疾患/疾病的体征或症状尚未发展或尚未被观察到。在一些实施方案中,治疗包括预防,而在其它实施方案中,治疗不包括预防。

[0115] 如本文所用的“启动子序列”是指能够在哺乳动物细胞,例如人类细胞(例如RPE细胞,例如ARPE-19细胞)中驱动表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,例如,为了驱动本文所述的BBB转运融合蛋白质的表达,启动子序列来自强哺乳动物启动子,例如人启动子序列。用于本文所述的表达盒中的强启动子的非限制性实例包括EF1A启动子、CAG启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)启动子和ACTB(人 β -肌动蛋白)启动子。在一个实施方案中,可用于驱动本文所述的ST蛋白质的表达的启动子序列可来自中等强度启动子,例如EFS启动子序列,其是EF1A启动子序列的缩短形式。

[0116] 如本文所用的“RPE细胞”是指具有以下特征中的一种或多种特征的细胞:a)其包含视网膜色素上皮细胞(RPE)(例如,使用ARPE-19细胞系(ATCC®CRL-2302™)培养)或由其衍生或修饰(例如通过用编码BBB转运融合蛋白质的外源序列稳定转染从ARPE-19细胞系培养的细胞来衍生或修饰)的细胞、衍生自RPE细胞的原代细胞培养物的细胞、直接从天然存在的RPE细胞(例如从人或其它哺乳动物)分离的细胞(没有长期培养,例如,自分离以来少于5或10代或轮细胞分裂)、衍生自转化的、永生化的或长期(例如,超过5或10代或轮细胞分裂)RPE细胞培养物的细胞;b)从分化程度较低的细胞获得的细胞,例如开发、编程或重编程(例如,在体外)成RPE细胞的细胞,或者除了任何遗传工程化之外与天然存在的RPE细胞或来自RPE细胞的原代或长期培养物的细胞中的一种或多种基本相似的细胞(例如,细胞可衍生自IPS细胞);c)具有一种或多种以下特性的细胞:i)其表达生物标志物CRALBP、RPE-65、RLBP、BEST1或 α B-晶状体蛋白质中的一种或多种;ii)其不表达生物标志物CRALBP、RPE-65、RLBP、BEST1或 α B-晶状体蛋白质中的一种或多种;iii)其天然存在于视网膜中并在布鲁赫膜中的脉络膜血管上方形成单层;或iv)其负责视网膜中的上皮运输、光吸收、分泌和免疫调节;或v)它是合成产生的,或由天然存在的细胞修饰的,以具有与永生化的RPE细胞系(例如,ARPE-19细胞系(ATCC®CRL-2302™))相同或基本相同的遗传内容物和任选的相同或基本上相同的表观遗传内容物。在一个实施方案中,本文所述的RPE被遗传修饰成例如具有新的特性,例如细胞被遗传修饰成表达并分泌本文所述的融合蛋白质。在一个实施方案中,细胞还被遗传修饰成减少或消除由亲本细胞天然表达的一种或多种蛋白质的表达。在其它实施方案中,RPE细胞是未经遗传修饰的。

[0117] 当在本文中用于指两个核苷酸序列或两个氨基酸序列时,“序列同一性”或“百分比同一”意指当在比较窗口或指定区域上比较和比对两个序列以获得最大对应性时,两个序列在指定区域内相同,或在指定区域内的指定百分比的核苷酸或氨基酸位置处具有相同的核苷酸或氨基酸。序列同一性可使用本领域已知的标准技术(包括但不限于美国专利申请公布第2017/0233445A1号中描述的任何算法)来确定。在一个实施方案中,同一的核苷酸或氨基酸位置的指定百分比是至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。

[0118] 如本文所用的“球形”意指具有形成球(例如,完全圆形的球体)或球样形状的弯曲

表面的设备(例如,水凝胶胶囊或其它颗粒),其例如在表面上可具有波浪和起伏。球和球样物体可通过围绕三个垂直轴a、b和c中的每一个旋转圆、椭圆或组合来从数学上定义。对于球,三个轴的长度相同。一般来说,球样形状是半主轴彼此相差在10%、5%或2.5%以内的椭球体(就其平均表面而言)。球或球样形状的直径是平均直径,如半主轴的平均值。

[0119] 如本文所用的“神经鞘脂贮积症”和“SP”是指参与鞘脂代谢的酶的缺乏,该缺乏导致鞘脂在溶酶体中累积并且可导致各种器官和组织(包括内脏和神经系统)出现各种表现。SP疾病包括戈谢病(Gaucher disease)和法布里病。

[0120] 如本文所用的“受试者”是指人类或非人类动物。在一个实施方案中,受试者是任何年龄组的人(即男性或女性),例如儿科人受试者(例如婴儿、儿童、青少年)或成人受试者(例如年轻人、中年人或老年人)。在一个实施方案中,受试者是非人类动物,例如哺乳动物(例如,小鼠、狗、灵长类动物(例如食蟹猴或恒河猴)。在一个实施方案中,受试者是商业相关的哺乳动物(例如,牛、猪、马、绵羊、山羊、猫或狗)或鸟类(例如,商业相关的鸟类,如鸡、鸭、鹅或火鸡)。在某些实施方案中,动物是哺乳动物。动物可以是雄性或雌性并且处于任何发育阶段。非人类动物可以是转基因动物。

[0121] 如本文所用的“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指减少、逆转、缓和CNS疾患或疾病,延迟CNS疾患或疾病的发作,或抑制CNS疾患或疾病的症状、表现或潜在原因中的一者或多者的进展。在一个实施方案中,治疗包括增加CNS中治疗性蛋白质的活性。在一个实施方案中,治疗包括减少、逆转、缓和与疾患或疾病相关的症状,延迟其发作或抑制其进展。在一些实施方案中,“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”需要已经发展或已经观察到与CNS疾患/疾病相关的体征或症状。在其它实施方案中,治疗可在没有疾病的体征或症状的情况下施用,例如在预防性治疗中。例如,可在症状发作之前向易感个体施用治疗(例如,根据症状史和/或根据遗传或其它易感性因素)。治疗也可以在症状已经消退之后继续进行,例如,以便延迟或预防复发。在一些实施方案中,治疗包括预防,而在其它实施方案中,治疗不包括预防。

[0122] “野生型”(wt)是指物种中多核苷酸、多肽或蛋白质的天然形式,包括序列。野生型形式与由于一种或多种基因突变而产生的多核苷酸、多肽或蛋白质的突变形式有所区别。

[0123] 所选择的化学定义

[0124] 具体官能团和化学术语的定义在下文更详细地描述。化学元素根据元素周期表,CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版,封二来鉴定,并且具体官能团通常如其中所描述来定义。此外,有机化学的一般原理以及具体官能部分和反应性描述于Thomas Sorrell,Organic Chemistry,University Science Books,Sausalito,1999;Smith和March,March's Advanced Organic Chemistry,第5版,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2001;Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers,Inc.,New York,1989;以及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis,第3版,Cambridge University Press,Cambridge,1987中。

[0125] 本文所使用的缩写具有其在化学和生物学领域中的常规含义。根据在化学领域已知的化学价的标准规则构建本文所示的化学结构和化学式。

[0126] 当列出值的范围时,意图涵盖该范围内的每个值和子范围。例如,“C₁-C₆烷基”意图涵盖C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₁-C₆、C₁-C₅、C₁-C₄、C₁-C₃、C₁-C₂、C₂-C₆、C₂-C₅、C₂-C₄、C₂-C₃、C₃-C₆、C₃-

C₅-C₃-C₄、C₄-C₆、C₄-C₅、以及C₅-C₆烷基。

[0127] 如本文所用,“烷基”是指具有1至24个碳原子的直链或支化饱和烃基团的基团(“C₁-C₂₄烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至12个碳原子(“C₁-C₁₂烷基”)、1至10个碳原子(“C₁-C₁₀烷基”)、1至8个碳原子(“C₁-C₈烷基”)、1至6个碳原子(“C₁-C₆烷基”)、1至5个碳原子(“C₁-C₅烷基”)、1至4个碳原子(“C₁-C₄烷基”)、1至3个碳原子(“C₁-C₃烷基”)、1至2个碳原子(“C₁-C₂烷基”)或1个碳原子(“C₁烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有2至6个碳原子(“C₂-C₆烷基”)。C₁-C₆烷基的实例包括甲基(C₁)、乙基(C₂)、正丙基(C₃)、异丙基(C₃)、正丁基(C₄)、叔丁基(C₄)、仲丁基(C₄)、异丁基(C₄)、正戊基(C₅)、3-戊烷基(C₅)、戊基(C₅)、新戊基(C₅)、3-甲基-2-丁烷基(C₅)、叔戊基(C₅)以及正己基(C₆)。烷基的另外实例包括正庚基(C₇)、正辛基(C₈)等。烷基的每个实例可独立地为任选取代的,即未取代的(“未取代的烷基”),或者被一个或多个取代基,例如1至5个取代基、1至3个取代基或1个取代基取代(“取代的烷基”)。

[0128] 如本文所用,“烯基”是指具有2至24个碳原子、一个或多个碳-碳双键且无三键的直链或支化烃基团的基团(“C₂-C₂₄烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至10个碳原子(“C₂-C₁₀烯基”)、2至8个碳原子(“C₂-C₈烯基”)、2至6个碳原子(“C₂-C₆烯基”)、2至5个碳原子(“C₂-C₅烯基”)、2至4个碳原子(“C₂-C₄烯基”)、2至3个碳原子(“C₂-C₃烯基”)或2个碳原子(“C₂烯基”)。一个或多个碳-碳双键可以是内部的(如在2-丁烯基中)或末端的(如在1-丁烯基中)。C₂-C₄烯基的实例包括乙烯基(C₂)、1-丙烯基(C₃)、2-丙烯基(C₃)、1-丁烯基(C₄)、2-丁烯基(C₄)、丁二烯基(C₄)等。C₂-C₆烯基的实例包括前面提到的C₂₋₄烯基以及戊烯基(C₅)、戊二烯基(C₅)、己烯基(C₆)等。烯基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的烯基”),或者被一个或多个取代基,例如1至5个取代基、1至3个取代基或1个取代基取代(“取代的烯基”)。

[0129] 如本文所用,术语“炔基”是指具有2至24个碳原子、一个或多个碳-碳三键的直链或支化烃基团的基团(“C₂-C₂₄炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至10个碳原子(“C₂-C₁₀炔基”)、2至8个碳原子(“C₂-C₈炔基”)、2至6个碳原子(“C₂-C₆炔基”)、2至5个碳原子(“C₂-C₅炔基”)、2至4个碳原子(“C₂-C₄炔基”)、2至3个碳原子(“C₂-C₃炔基”)或2个碳原子(“C₂炔基”)。一个或多个碳-碳三键可以是内部的(如在2-丁炔基中)或末端的(如在1-丁炔基中)。C₂-C₄炔基的实例包括乙炔基(C₂)、1-丙炔基(C₃)、2-丙炔基(C₃)、1-丁炔基(C₄)、2-丁炔基(C₄)等。炔基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的炔基”),或者被一个或多个取代基,例如1至5个取代基、1至3个取代基或1个取代基取代(“取代的炔基”)。

[0130] 如本文所用,术语“杂烷基”是指包括至少一个碳原子和至少一个选自O、N、P、Si和S组成的组的杂原子的非环状稳定的直链或支化链或它们的组合,并且其中氮原子和硫原子可任选地被氧化,并且氮杂原子可任选地被季铵化。一个或多个杂原子O、N、P、S和Si可被放置于杂烷基的任何位置处。示例性杂烷基包括但不限于: -CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃、-CH=CH-N(CH₃)-CH₃、-O-CH₃和-O-CH₂-CH₃。至多两个或三个杂原子可以是连续的,诸如例如-CH₂-NH-OCH₃和-CH₂-O-Si(CH₃)₃。在叙述“杂烷基”,后面接着具体杂烷基如-CH₂O、-NR^CR^D等的叙述时,将理解,术语杂烷基和-CH₂O或-NR^CR^D并不冗余或互相排斥。而是,叙述具体杂烷基以增加清晰性。因此,术语“杂烷基”在此不应

解释为排除具体杂烷基基团,如 $-\text{CH}_2\text{O}$ 、 $-\text{NR}^{\text{C}}\text{R}^{\text{D}}$ 等。杂环基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的杂烷基”),或者被一个或多个取代基,例如1至5个取代基、1至3个取代基或1个取代基取代(“取代的杂烷基”)。

[0131] 除非另有说明,否则术语“亚烷基”、“亚烯基”、“亚炔基”或“亚杂烷基”单独或作为另一个取代基的一部分分别意指衍生自烷基、烯基、炔基或杂烷基的二价基团。亚烷基、亚烯基、亚炔基或亚杂烷基可被描述为例如 C_1 - C_6 元亚烷基、 C_2 - C_6 元亚烯基、 C_2 - C_6 元亚炔基或 C_1 - C_6 元亚杂烷基,其中术语“元(membered)”是指该部分内的非氢原子在亚杂烷基的情况下,杂原子还可占据一个或两个链末端(例如,亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)。更进一步,对于亚烷基和亚杂烷基连接基团,连接基团的取向并非由书写连接基团的化学式的方向所暗示。例如,式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 可表示 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 和 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ 两者。

[0132] 如本文所用,“芳基”是指单环或多环(例如,双环或三环) $4n+2$ 芳族环系统(例如,具有在环阵列中共享的6、10,或14个 π 电子)的基团,在该芳族环系统中具有6-14个环碳原子和零个杂原子(“ C_6 - C_{14} 芳基”)。在一些实施方案中,芳基具有6个环碳原子(“ C_6 芳基”;例如苯基)。在一些实施方案中,芳基具有10个环碳原子(“ C_{10} 芳基”;例如萘基,诸如1-萘基和2-萘基)。在一些实施方案中,芳基具有14个环碳原子(“ C_{14} 芳基”;例如,蒽基)。芳基可被描述为例如 C_6 - C_{10} 元芳基,其中术语“元”是指该部分内的非氢环原子。芳基包括苯基、萘基、蒽基和四氢萘基。芳基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的芳基”),或者被一个或多个取代基取代的(“取代的芳基”)。

[0133] 如本文所用,“杂芳基”是指5-10元单环或双环 $4n+2$ 芳族环系统(例如,具有在环阵列中共享的6或10个 π 电子)的基团,在该芳族环系统中具有环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-10元杂芳基”)。在含有一个或多个氮原子的杂芳基中,当价态允许时,附接点可以是碳或氮原子。杂芳基双环系统可以包括一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂芳基”还包括其中如上文定义的杂芳基环与一个或多个芳基稠合的环系统,其中附接点是在芳基或杂芳基环上,并且在此类情况下,环成员的数目指示稠合的(芳基/杂芳基)环系统中的环成员的数目。双环杂芳基,其中一个环不含杂原子(例如,吡啶基、喹啉基、咪唑基等),附接点可以在任一环,即携带杂原子的环(例如,2-吡啶基)或不杂原子的环(例如,5-吡啶基)上。杂芳基可被描述为例如6-10元杂芳基,其中术语“元”是指该部分内的非氢环原子。

[0134] 在一些实施方案中,杂芳基是5-10元芳香族环系统,在该芳香族环系统中具有环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-10元杂芳基”)。在一些实施方案中,杂芳基是5-8元芳香族环系统,在该芳香族环系统中具有环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-8元杂芳基”)。在一些实施方案中,杂芳基是5-6元芳香族环系统,在该芳香族环系统中具有环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-6元杂芳基”)。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有1-3个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有1-2个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有1个选自氮、氧和硫的环杂原子。杂芳基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的杂芳基”),或者被一个或多个取代基取代(“取代的杂芳基”)。

[0135] 含有1个杂原子的示例性5元杂芳基包括但不限于吡咯基、呋喃基和苯硫基。含有2

个杂原子的示例性5元杂芳基包括但不限于咪唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基以及异噻唑基。示例性的含有三个杂原子的5元杂芳基包括但不限于三唑基、噁二唑基和噻二唑基。含有4个杂原子的示例性5元杂芳基包括但不限于四唑基。含有1个杂原子的示例性6元杂芳基包括但不限于吡啶基。示例性的含有两个杂原子的6元杂芳基包括但不限于哒嗪基、嘧啶基和吡嗪基。含有3或4个杂原子的示例性6元杂芳基分别包括但不限于三嗪基和四嗪基。含有1个杂原子的示例性7元杂芳基包括但不限于氮杂卓基、氧杂卓基和硫杂卓基。示例性的5,6-双环杂芳基包括但不限于吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、异苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并异呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噁二唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噻二唑基、吡啶嗪基和嘌呤基。示例性6,6-双环杂芳基包括但不限于萘啶基、蝶啶基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹喔啉基、酞嗪基以及喹唑啉基。其它示例性杂芳基包括血红素和血红素衍生物。

[0136] 如本文所用,术语“亚芳基”和“亚杂芳基”单独或作为另一个取代基的一部分分别意指衍生自芳基和杂芳基的二价基团。

[0137] 如本文所用,“环烷基”是指在非芳香族环系统中具有3至10个环碳原子(“C₃-C₁₀环烷基”)和0个杂原子的非芳香族环状烃基团的基团。在一些实施方案中,环烷基具有3至8个环碳原子(“C₃-C₈环烷基”)、3至6个环碳原子(“C₃-C₆环烷基”)或5至10个环碳原子(“C₅-C₁₀环烷基”)。环烷基可被描述为例如C₄-C₇元环烷基,其中术语“元”是指该部分内的非氢环原子。示例性C₃-C₆环烷基包括但不限于环丙基(C₃)、环丙烯基(C₃)、环丁基(C₄)、环丁烯基(C₄)、环戊基(C₅)、环戊烯基(C₅)、环己基(C₆)、环己烯基(C₆)、环己二烯基(C₆)等。示例性C₃-C₈环烷基包括但不限于前面提到的C₃-C₆环烷基以及环庚基(C₇)、环庚烯基(C₇)、环庚二烯基(C₇)、环庚三烯基(C₇)、环辛基(C₈)、环辛烯基(C₈)、立方烷基(C₈)、双环[1.1.1]戊烷基(C₅)、双环[2.2.2]辛烷基(C₈)、双环[2.1.1]己烷基(C₆)、双环[3.1.1]庚烷基(C₇)等。示例性C₃-C₁₀环烷基包括但不限于前面提到的C₃-C₈环烷基以及环壬基(C₉)、环壬烯基(C₉)、环癸基(C₁₀)、环癸烯基(C₁₀)、八氢-1H-茛基(C₉)、十氢萘基(C₁₀)、螺[4.5]癸烷基(C₁₀)等。如前述实例所阐明的,在某些实施方案中,环烷基是单环的(“单环环烷基”)抑或含有稠合、桥联或螺环系统(如双环系统(“双环环烷基”)),并且可以是饱和的或者可以是部分不饱和的。“环烷基”还包括环系统,其中如上文所定义的环境基环与一个或多个芳基稠合,其中附接点在环烷基环上,并且在此类情况下,碳的数目继续表示环烷基环系统中的碳的数目。环烷基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的环烷基”),或者被一个或多个取代基取代(“取代的环烷基”)。

[0138] 如本文所用的“杂环基”是指具有环碳原子和1至4个环杂原子的3至10元非芳香族环系统的基团,其中每个杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷和硅(“3-10元杂环基”)。在含有一个或多个氮原子的杂环基中,附接点可以是碳或氮原子,只要化合价允许。杂环基可以是单环的(“单环杂环基”)或稠合、桥连或螺环系统,诸如双环系统(“双环杂环基”),并且可以是饱和的或可以是部分不饱和的。杂环基双环系统可以包括一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂环基”还包括环系统,其中如上文所定义的杂环基环与一个或多个环烷基稠合,其中附接点在环烷基或杂环基环上;或环系统,其中如上文所定义的杂环基环与一个或多个芳基或杂芳基稠合,其中附接点在杂环基环上,并且在此类情况下,环成员的数目继续表示杂环基环系统中的环成员的数目。杂环基可被描述为例如3-7元杂环基,其中术语“元”

是指该部分内的非氢环原子,即碳、氮、氧、硫、硼、磷以及硅。杂环基的每个实例可独立地为任选取代的,即,未取代的(“未取代的杂环基”),或者被一个或多个取代基取代(“取代的杂环基”)。在某些实施方案中,杂环基是未取代的3-10元杂环基。在某些实施方案中,杂环基是取代的3-10元杂环基。

[0139] 在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-10元非芳香族环系统,其中每个杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷和硅(“5-10元杂环基”)。在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-8元非芳香族环系统,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-8元杂环基”)。在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-6元非芳香族环系统,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-6元杂环基”)。在一些实施方案中,5-6元杂环基具有1-3个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂环基具有1-2个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂环基具有1个选自氮、氧和硫的环杂原子。

[0140] 含有1个杂原子的示例性3元杂环基包括但不限于氮丙啶基、环氧乙烷基和环硫乙烷基。含有1个杂原子的示例性4元杂环基包括但不限于氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基和硫杂环丁烷基。含有1个杂原子的示例性5元杂环基包括但不限于四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢苯硫基、二氢苯硫基、吡咯烷基、二氢吡咯基和吡咯基-2,5-二酮。示例性的含有两个杂原子的5元杂环基包括但不限于二氧戊环基、氧硫杂环戊烷基、二硫杂环戊烷基和噁唑烷-2-酮。含有3个杂原子的示例性5元杂环基包括但不限于三唑啉基、噁二唑啉基和噻二唑啉基。含有1个杂原子的示例性6元杂环基包括但不限于哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、二氢吡啶基和噻烷基(thianyl)。含有2个杂原子的示例性6元杂环基包括但不限于哌嗪基、吗啉基、二噻烷基和二噁烷基。含有两个杂原子的示例性6元杂环基包括但不限于三嗪烷基(triazinanyl)或硫代吗啉基-1,1-二氧化物。含有1个杂原子的示例性7元杂环基包括但不限于,氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基和硫杂环庚烷基。含有1个杂原子的示例性8元杂环基包括但不限于,氮杂环辛烷基、氧杂环辛烷基和硫杂环辛烷基。稠合至C₆芳基环的示例性5元杂环基(在本文中也称为5,6-双环杂环)包括但不限于吡啶基、异吡啶基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、苯并噁唑啉酮基等。稠合至芳基环的示例性6元杂环基(在本文中也称为6,6-双环杂环)包括但不限于四氢喹啉基、四氢异喹啉基等。

[0141] 如本文所用的“氨基”是指基团-NR⁷⁰R⁷¹,其中R⁷⁰和R⁷¹各自独立地为氢、C₁-C₈烷基、C₃-C₁₀环烷基、C₄-C₁₀杂环基、C₆-C₁₀芳基以及C₅-C₁₀杂芳基。在一些实施方案中,氨基是指NH₂。

[0142] 如本文所用,“氰基”是指-CN。

[0143] 除非另有说明,否则如本文所用,“卤基”或“卤素”独立地或作为另一个取代基的一部分意指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)原子。

[0144] 如本文所用,“羟基”是指基团-OH。

[0145] 如本文定义的烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基以及杂芳基是任选取代的(例如,“取代的”或“未取代的”烷基、“取代的”或“未取代的”烯基、“取代的”或“未取代的”炔基、“取代的”或“未取代的”杂烷基、“取代的”或“未取代的”环烷基、“取代的”或“未取代的”杂环基、“取代的”或“未取代的”芳基,或“取代的”或“未取代的”杂芳基)。一般来说,术语“取代的”,无论之前有无术语“任选地”,都意指基团(例如,碳或氮原子)上存在的

至少一个氢被可允许的取代基置换,该可允许的取代基例如是取代后产生稳定的化合物的取代基,该稳定的化合物例如是不会自发地如通过重排、环化、消除或其它反应而进行转化的化合物。除非另外说明,否则“取代的”基团在该基团的一个或多个可取代的位置处具有取代基,并且当任何给定结构中的多于一个位置被取代时,该取代基在每个位置处是相同或不同的。术语“取代的”预期包括用有机化合物的所有允许的取代基,如本文所述的产生稳定化合物的形成的任何取代基取代。本公开考虑了任何和所有此类组合以达成稳定的化合物。出于本公开的目的,杂原子(如氮)可具有氢取代基和/或如本文所述的满足杂原子的化合价并且产生稳定部分的形成的任何合适的取代基。

[0146] 两个或更多个取代基可以任选地联接以形成芳基、杂芳基、环烷基或杂环基基团。此类所谓的成环取代基通常但不一定附接至环状基本结构。在一个实施方案中,成环取代基附接至基本结构的相邻成员。例如,附接至环状基本结构的相邻成员的两个成环取代基形成稠环结构。在另一个实施方案中,成环取代基附接至基本结构的单个成员。例如,附接至环状基本结构的单个成员的两个成环取代基形成螺环结构。在另一个实施方案中,成环取代基附接至基本结构的不相邻成员。

[0147] 本文所述的式(III)化合物及其药学上可接受的盐可包含一个或多个不对称中心,并且因此可以以各种异构体形式(例如对映异构体和/或非对映异构体)存在。例如,本文所述的化合物可呈单独对映异构体、非对映异构体或几何异构体的形式,或者可呈立体异构体混合物(包括外消旋混合物以及富含一种或多种立体异构体的混合物)的形式。异构体可通过本领域的技术人员已知的方法从混合物中分离,该方法包括手性高压液相色谱法(HPLC)以及手性盐的形成和结晶;或者优选的异构体可通过不对称合成来制备。参见例如, Jacques等人, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen等人, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); 以及 Wilen, *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* 第268页 (E.L. Eliel, 编辑, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本公开另外涵盖基本上不含有其它异构体的单独异构体形式,以及可替代地呈不同异构体的混合物形式的本文描述的化合物。

[0148] 如本文所用,纯对映异构体化合物基本上不含化合物的其它对映异构体或立体异构体(即,呈对映体过量)。换言之,化合物的“S”形式基本上不含化合物的“R”形式,并且因此呈“R”形式的对映体过量。术语“对映异构纯的”或“纯对映异构体”表示化合物包含多于75重量%、多于80重量%、多于85重量%、多于90重量%、多于91重量%、多于92重量%、多于93重量%、多于94重量%、多于95重量%、多于96重量%、多于97重量%、多于98重量%、多于99重量%、多于99.5重量%或多于99.9重量%的对映异构体。在某些实施方案中,重量是基于化合物的所有对映异构体或立体异构体的总重量。

[0149] 本文所述的式(III)化合物还可包含一种或多种同位素取代。例如,H可处于任何同位素形式,包括¹H、²H(D或氘)和³H(或氚);C可处于任何同位素形式,包括¹²C、¹³C和¹⁴C;O可处于任何同位素形式,包括¹⁶O和¹⁸O等。

[0150] 术语“药学上可接受的盐”意图包括根据本文所述的化合物上发现的特定取代基用相对无毒的酸或碱制备的活性化合物的盐。当用于制备本公开的设备的式(III)化合物含有相对酸性的官能团时,可以通过使此类化合物的中性形式与足量的期望碱(纯的或在

合适的惰性溶剂中) 接触来获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐的实例包括钠、钾、钙、铵、有机氨基或镁盐, 或类似盐。当本公开中使用的化合物含有相对碱性的官能团时, 可通过使中性形式的此类化合物与足量的所需的酸纯净地或于适合的惰性溶剂中接触来获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括衍生自无机酸, 如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或亚磷酸等的那些盐; 以及衍生自有机酸, 如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等的盐。还包括氨基酸的盐, 诸如精氨酸盐等; 和有机酸, 如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等的盐 (参见例如, Berge 等人, *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977))。本公开的设备 (例如, 颗粒、水凝胶胶囊) 中使用的某些特定化合物含有允许该化合物转化成碱加成盐或酸加成盐的碱性和酸性官能基两者。这些盐可通过本领域技术人员已知的方法制备。本领域技术人员已知的其它药学上可接受的载体也适合用于本公开中。

[0151] 本公开的设备可含有呈前药形式的式 (III) 化合物。前药是在生理条件下容易发生化学变化以提供可用于制备本公开中的设备的化合物的那些化合物。另外, 前药可在离体环境中通过化学或生物化学方法转化成有用的式 (III) 化合物。

[0152] 本文所述的某些式 (III) 化合物可以非溶剂化形式以及溶剂化形式 (包括水合形式) 存在。一般来说, 溶剂化形式等效于非溶剂化形式并且涵盖在本公开的范围。本文所述的某些式 (III) 化合物可以多种结晶或无定形形式存在。一般来说, 所有物理形式对于本公开所涵盖的用途而言都是等效的并且意图落入本公开的范围。

[0153] 术语“溶剂合物”是指通常通过溶剂分解反应与溶剂缔合的化合物的形式。这种物理缔合可包括氢键合。常用的溶剂包括水、甲醇、乙醇、乙酸、DMSO、THF、乙醚等。本文所述的化合物可例如以结晶形式制备, 并且可被溶剂化。适合的溶剂合物包括药学上可接受的溶剂合物并且进一步包括化学计量的溶剂合物和非化学计量的溶剂合物。

[0154] 术语“水合物”是指与水缔合的化合物。通常, 包含在化合物的水合物中的水分子的数目处于与水合物中的化合物分子的数目的一定的比率下。因此, 化合物的水合物可例如由通式 $R \cdot x H_2O$ 表示, 其中 R 是化合物并且其中 x 是大于 0 的数字。

[0155] 如本文所用的术语“互变异构体”是指作为可互换形式的化合物结构并且在氢原子和电子移位方面变化的化合物。因此, 通过 π 电子和原子 (通常是 H) 的移动, 两种结构可处于平衡状态。例如, 烯醇类和酮类是互变异构体, 因为它们可通过用酸抑或碱处理进行快速地相互转换。互变异构形式可与获得目标化合物的最优化学反应性和生物活性相关。

[0156] 如本文所用的符号“”是指与实体, 例如聚合物 (例如形成水凝胶的聚合物, 如藻酸盐) 或可植入设备 (例如, 颗粒、水凝胶胶囊) 的表面的连接。由“”表示的连接可以指与实体 (例如聚合物或可植入元件) 的直接附接, 可以指通过附接基团与实体的键联。如本文所述的“附接基团”是指用于将式 (III) 化合物键联至实体 (例如, 如本文所述的聚合物或可植入元件 (例如设备)) 的部分, 并且可包含本领域已知的任何附接化学物 (chemistry)。示例性附接基团的列表概述在 *Bioconjugate Techniques* (第 3 版, Greg T. Hermanson, Waltham, MA: Elsevier, Inc, 2013) 中, 其通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中, 附接基团包括烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、 $-C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-N(R^C)-$ 、 $-N(R^C)C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^C)-$ 、 $-N(R^C)N(R^D)-$ 、 $-NCN-$ 、 $-C(=N(R^C)(R^D))$

$O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-OS(O)_x-$ 、 $-N(R^C)S(O)_x-$ 、 $-S(O)_xN(R^C)-$ 、 $-P(R^F)_y-$ 、 $-Si(OR^A)_2-$ 、 $-Si(R^G)(OR^A)-$ 、 $-B(OR^A)-$ 或金属,其中 R^A 、 R^C 、 R^D 、 R^F 、 R^G 、 x 和 y 中的每一者均独立地如本文所述。在一些实施方案中,附接基团包括胺、酮、酯、酰胺、烷基。在一些实施方案中,附接基团是交联剂。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)(C_1-C_6)^1$,并且 R^1 如本文所述。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)(C_1-C_6-亚烷基)-$,其中亚烷基被1-2个烷基(例如1-2个甲基)取代。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)C(CH_3)_2-$ 。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)(亚甲基)-$,其中亚烷基被1-2个烷基(例如1-2个甲基)取代。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)CH(CH_3)-$ 。在一些实施方案中,附接基团是 $-C(O)C(CH_3)-$ 。

[0157] BBB转运融合蛋白质的特征

[0158] 本公开的BBB转运融合蛋白质包含HSA结合结构域(AB)和位于货物部分(C)(例如,治疗性蛋白质的氨基酸序列)上游的IGF1R结合结构域(RB)。在一些实施方案中,第一接头部分(例如,接头肽)位于AB与RB之间,并且第二接头部分(例如,接头肽)位于RB与货物部分之间。

[0159] HSA结合结构域AB

[0160] BBB转运蛋白质的血清半衰期比没有AB结构域的在其它方面同一的融合蛋白质的血清半衰期更长。这种半衰期延长主要是由于融合蛋白质经由AB与HSA结合。成熟人血清白蛋白(HSA)是具有585个氨基酸的单体蛋白质(GenBank登录号AAA98797.1),并且含有三个同源结构域DI(图2B的氨基酸25-221);DII(图2B的氨基酸213-409);和DIII(图2B的氨基酸405-609)(Dockal, M.等人, J. Biol. Chem., 第274卷, 第41期, 第29303-29310页(1999))。白蛋白在血液中的长半衰期主要由以下两个特征驱动:(i)白蛋白的大尺寸(65kDa)限制其肾小球滤过率;和(ii)白蛋白在低pH(pH 6)下结合至FcRn,从而通过使白蛋白从早期内体循环回到胞外环境来保护白蛋白在内皮细胞和上皮细胞中的被动内吞后不在溶酶体中降解。在一个实施方案中,AB结构域赋予BBB转运融合蛋白质这样的在人体内的血清半衰期(表示为 $t_{1/2-\beta}$),该血清半衰期超过6小时、12小时、24小时、72小时、一周、两周或高达HSA在人体内的半衰期(估计为约19天)中的任一者。

[0161] 在一些实施方案中,AB结构域对血清白蛋白具有特异性,即AB结构域基本上不与任何非白蛋白蛋白质结合。在一些实施方案中,融合蛋白质基本上不抑制FcRn与HSA的结合,HAS的结合位点位于DIII中。在一个实施方案中,在存在本公开的融合蛋白质的情况下,发生FcRn与HSA的结合的小于约20%、15%、10%、5%或1%抑制,其可通过本领域中已知的任何竞争结合测定,例如WO 2019/204925的[0095]中或US 2019/0367596A1的实施例3中描述的SPR竞争结合测定来确定。可通过从不与DIII结合的抗HSA抗体衍生出AB结构域来降低干扰FcRn结合的可能性。在一个实施方案中,融合蛋白质经由AB结构域与HSA的DI结合。在一个实施方案中,融合蛋白质经由AB与由WO2019/204925中描述的单结构域抗体(sdAb),即R11、R28、M75或M79的氨基酸序列组成的sdAb交叉竞争与HSA的结合。

[0162] 在一些实施方案中,AB(作为融合蛋白质的一部分)还与来自一种、两种、三种、四种或更多种其它哺乳动物物种,例如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猫、狗、猪、绵羊、马、牛和猴(例如,恒河猴和/或食蟹猴)中的两种、三种、四种或更多种的任何组合的血清白蛋白结合(例如,交叉反应)。在一个实施方案中,融合蛋白质经由AB结构域与来自至少小鼠、大鼠、猴(恒河猴或食蟹猴)和人类的血清白蛋白结合。在一个实施方案中,融合蛋白质经由AB结构

域与来自至少小鼠、狗和人类的血清白蛋白结合。

[0163] 在一些实施方案中,AB结构域(作为融合蛋白质的一部分)在约5.0或约5.5直至约7.4之间的pH范围内以所需的亲和力结合至HSA并且任选地结合至至少一种其它哺乳动物血清白蛋白。在一个实施方案中,所需的亲和力是在约0.1nM至约1,000nM、约0.5nM至约500nM、约1nM至约250nM、约5nM至约50nM、约10nM至约25nM或约0.5nM至约1nM中的任一个的范围内的解离常数(K_D)。在一个实施方案中,亲和力是通过在25℃和约5.5至约7.4的pH范围下的表面等离子体共振 (SPR) 来确定的。在一个实施方案中,融合蛋白质对来自小鼠、大鼠和猴的血清白蛋白的亲和力与对HSA的亲和力相似,例如,在对HSA的 K_D 的70%至130%、80%至120%或90%至110%以内。

[0164] 用于测量抗HSA抗体和融合蛋白质的 K_D 的示例性SPR测定在WO 2019/204925的[0092]中有所描述。用于测量在5.0至7.4的pH范围内的亲和力的另一种示例性SPR测定在US 2019/0367597A1中有描述。抗HSA抗体和融合蛋白质对HSA和哺乳动物直向同源物的 K_D 也可基本上如WO 2019/246003在[0994] - [0995]中所述来确定。

[0165] 本公开的BBB转运融合蛋白质的AB结构域包含抗HSA抗体的重链可变区 (HCVR) 的氨基酸序列。为了促进经遗传修饰的细胞表达融合蛋白质,在一些实施方案中,AB结构域具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量。AB结构域可衍生自本领域中已知的任何抗HSA抗体分子,包括常规4链抗体、抗原结合片段、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(双链和单链(scFv))、微型抗体、双抗体和sdAb。在一个实施方案中,AB实质上由或由sdAb的HCVR氨基酸序列组成。

[0166] 在一个实施方案中,AB结构域包含WO 2006/122787的表I中描述的抗HSA sdAb中的一个抗HSA sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合。在一个实施方案中,AB实质上由或由WO 2006/22787的表II中描述的抗HSA sdAb中的一个抗HSA sdAb(例如,A1b-1)中的氨基酸序列,或WO 2006/22787的表III中描述的A1b-1的人源化变体中的一个人源化变体(例如,A1b-8)中的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,AB实质上由或由WO 2012/175400中描述的A1b-23序列中的任一个A1b-23序列(例如,A1b-23D)组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与WO 2006/22787(例如A1b-8)或WO 2012/175400(例如A1b-23D)中描述的抗HSA sdAb中的任一个抗HSA sdAb交叉竞争结合至HSA。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质不包含A1b-1的氨基酸序列。在一个实施方案中,BBB转运融合蛋白质不包含A1b-8的氨基酸序列。

[0167] 在另一实施方案中,AB结构域实质上由或由WO 2019/246003的表7中描述的白蛋白结合结构域(ABD),例如LAELAKVLNRELD KYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP(SEQ ID NO:40)(其在WO 2019/246003中被描述为对HSA的 K_D 为约1.2nM的AB D)的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,AB结构域包含在WO 2019/246003的表14中描述的抗HSA P367抗体的三个CDR。在一个实施方案中,AB实质上由或由抗HSA P367抗体或其人源化变体P494(其中的每一者均列于WO 2019/246003的表14中)的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与WO 2019/246003中描述的P494 sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0168] 在另一个实施方案中,AB结构域包含在WO 2021/119551的表5中描述的抗HSA sdAb中的一个抗HSA sdAb中的三个重链CDR氨基酸序列的集合。在一个实施方案中,AB实质上由或由WO 2021/119551的表5中描述的抗HSA sdAb中的一个抗HSA sdAb中的VH氨基酸序

列组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与W0 2021/119551的表5中描述的sdAb中的一个或多个sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0169] 在另一个实施方案中,AB结构域包含位于US20190367597A1的表B中描述的T0235002C06 sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合。在一个实施方案中,AB实质上由或由US 2019/0367597A1的表B中描述的T0235002C06的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与US 20190367597A1的表B中描述的T0235002C06 sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0170] 在另一个实施方案中,AB结构域包含位于US 20190367596A1的表B中描述的T0235005D04 sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合。在一个实施方案中,AB实质上由或由US 2019/0367596A1的表B中描述的T0235005D04的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与US 20190367596A1的表B中描述的T0235002D04 sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0171] 在另一个实施方案中,AB结构域包含位于US 20190367598A1的表B中描述的T0235005G01或T023500043sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合。在一个实施方案中,AB实质上由或由US 20190367598A1的表B中描述的T0235005G01或T023500043的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,本公开的BBB转运融合蛋白质与US 20190367598A1的表B中描述的T0235005G01或T023500043sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0172] 在一个实施方案中,AB结构域包含位于W0 2019/204925中描述的R28、R11、M75或M79 sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合。这些CDR序列在下表2A中列出。

[0173] 表2A:AB结构域的示例性CDR氨基酸序列。

[0174]

sdAb	CDR1	CDR2	CDR3
R11	GFLLRSNTM (SEQ ID NO:41)	IRPSGLT (SEQ ID NO:42)	HTRPPFQRDS (SEQ ID NO:43) 或 ATRPPFQRDS (SEQ ID NO:44)

[0175]

R28	GRTFIAYA (SEQ ID NO:1)	ITNFAGGTT (SEQ ID NO:2)	AADRSAQTMRQVRPVLPLY (SEQ ID NO:3)
M75	GRTFDNYVM (SEQ ID NO:45)	ISGSGSIT (SEQ ID NO:46)	AAGSRRTYYREPKFYPS (SEQ ID NO: 47)
M79	GSTFSSSSV (SEQ ID NO:48)	ITSGGST (SEQ ID NO:49)	NVAGRNWVPISRYSPGPY (SEQ ID NO:50) 或 AVAGRNWVPISRYSPGPY (SEQ ID NO: 51)

[0176] 在一个实施方案中,AB实质上由或由W0 2019/204925中描述的R28、R11、M75或M79 sdAb的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,AB实质上由或由W0 2019/204925中描述的R28、R11、M75或M79的人源化变体中的一个入源化变体的氨基酸序列组成。R28、R11、M75和M79的亲本和入源化变体的氨基酸序列示于W0 2019/204925的第46-48页的序列表中。在一个实施方案中,AB实质上由或由选自本文下表2B中所示的亲本和入源化序列的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,AB实质上由或由下表2B中所示的R28的亲本或入源化氨基酸序列

组成。

[0177] 表2B:AB结构域的示例性氨基酸序列。

sdAb	亲本序列	示例性人源化序列
[0178]	R11 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSC VGPGFLLRSNTMGWYRQAPGK ERELVAFIRPSGLTNYNDAVQGR FTISRDNANKNTVYLQMNALKPE DTAVYYCHTRPPFQRDSWGQG TQVTVSS (SEQ ID NO:52)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGP GFLLRSNTMGWYRQAPGKERELVA FIRPSGLTNYNDAVQGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCHTRP PFQRDSWGQGLTV TVSS (SEQ ID NO:53)
	R28 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC VASGRTFIAYAMGWFRQAPGKE REFVAAITNFAGGTTYADSVK GRFTISRDNAKTTVYLQMNLSK PEDTALYYCAADRSAQTMRQV RPVLPYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:4)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVA AITNFAGGTTYADSVKGRFTISR DNAKTTVYLQMNLSRAEDTAVYYCA ADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:5)
	M75 QVQLVESGGGFVQAGGSLRLSC AASGRTFDNYVMAWFRQAPGK EREFVASISGSGSITNYANSVKD RFTISRDSAKNAIYLQMNLSKPE DTALYYCAAGSRRTYYREPKFY PSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:54)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFDNYVMAWFRQAPGKGLEFVS SISGSGSITNYANSVKDRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAG SRRTYYREPKFYPSWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:55)
[0179]	M79 QVKLEESGGGLVQAGGSLKLSC AASGSTFSSSSVGWYRQAPGQQ RELVAAITSGGSTNTADSVKGRF TMSRDNANKNTVYLQMRDLKPE DTAVYYCNVAGRNVWPISRYSP GPYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:56)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTFSSSSVGWYRQAPGKGLEL VSAITSGGSTNTADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCN VAGRNVWPISRYSPGPYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:57)

[0180] IGF1R结合结构域RB

[0181] 本公开的BBB转运融合蛋白质的RB结构域赋予融合蛋白质经由由IGF1R(也称为CD221、IGFIR、IGFR和JTK13)介导的转胞吞作用穿过BBB的能力。人IGF1R被合成为具有30个氨基酸的信号序列(UniProtKB-P08069)的单体型的1367个氨基酸的前-原受体(pre-proreceptor)。信号肽裂解后,原受体被糖基化、二聚化并被转运至高尔基体,在高尔基体中弗林蛋白酶裂解产生 α 和 β 亚基,该 α 和 β 亚基形成二硫连接的四聚体(β - α - α - β),该四聚体被转运至质膜。完全成熟的细胞膜结合的IGF1R由具有若干 α - α 和 α - β 二硫键的两个130至135kDa的 α 亚基和两个90至95kDa的 β 亚基组成。 α 亚基完全位于胞外并且形成配体结合结构域。 β 亚基含有胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域。配体结合诱导多种多样的下游信号传导分子的跨自磷酸化和磷酸化。

[0182] RB结构域赋予本文所述的融合蛋白质hIGF1R介导的转胞吞作用的能力可通过本领域已知的任何方法进行评估。例如,体外测定可评价融合蛋白质向IGF1-R表达细胞(如MCF-7细胞或原代人微血管脑内皮细胞(HMBEC))中的内化,如EP3725806A1的[0317]-[0315]中所述。在RB与大鼠IGF1-R交叉反应时可使用的类似测定采用如US 10,100,117中所述的永生大鼠脑内皮细胞(svARBEC)。此外,已知的体外和体内BBB模型可被用于评价

与人和大鼠IGF1R结合的融合蛋白质的BBB转运能力,例如,如US 10,100,117的实施例10和12中所述。

[0183] 在一些实施方案中, RB结构域对IGF1R具有特异性, 即RB结构域基本上不与胰岛素受体或任何其它非IGF1R蛋白质结合。含有RB的融合蛋白质不应通过IGF1R或IR诱导信号传导, 并且也不应抑制由胰岛素、IGF-1或IGF-2诱导的通过IGF1R或IR进行的信号传导。可通过分析IGF1R和IR和/或受体刺激的下流激酶Akt的磷酸化来评估本文所述的BBB转运融合蛋白质的信号传导影响。此评估可使用本领域中已知的, 例如如US 10,100,117的实施例14中或EP3725806A1的段落[0325] - [0327]中所述的任何方法进行。可使用本领域中已知的任何方法, 例如通过如EP3725806A1的[0320] - [0324]中描述的MCF-7细胞系增殖测定来评估融合蛋白质对通过IGF1R的IGF1信号传导的任何影响。

[0184] 可通过从已知不会干扰配体结合的抗hIGF1R抗体分子获得RB结构域或选择不与 α 亚基结合的抗体来降低干扰配体结合的可能性。在一个实施方案中, 融合蛋白质经由RB结构域与US 10,100,117中描述的IGF1R-5sAb、US 10,106,614中描述的IGF1R-3sAb或US 10,112,998中描述的IGF1R-5sAb交叉竞争hIGF1R结合。在一个实施方案中, 融合蛋白质经由RB结构域与EP3725806A1中描述的996、1226和1564抗体中的任一者交叉竞争hIGF1R结合。在一个实施方案中, RB结构域的表位具有三个结合位点: 结合位点1包括R650、Y775、P776、F778、E779、S791和L798中的一个或多个; 结合位点2包括L641、H808、E809和L813中的一个或多个; 并且结合位点3包括V397、W434、D435、Y460和C488中的一个或多个。

[0185] 在一些实施方案中, RB (作为融合蛋白质的一部分) 还与来自一种、两种、三种、四种或更多种其它哺乳动物物种, 例如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猫、狗、猪、绵羊、马、牛和猴 (例如, 恒河猴和/或食蟹猴) 中的两种、三种、四种或更多种的任何组合的IGF1R结合 (例如, 交叉反应)。在一个实施方案中, 融合蛋白质经由RB结构域与来自至少小鼠、大鼠、猴 (恒河猴或食蟹猴) 和人类的IGF1R结合。在一个实施方案中, 融合蛋白质经由RB结构域与来自至少小鼠、狗和人类的IGF1R结合。

[0186] 在一些实施方案中, RB结构域 (作为融合蛋白质的一部分) 在约5.0或约5.5直至约7.4之间的pH范围内以所需的亲和力结合至hIGF1R并且任选地结合至至少一种其它哺乳动物IGF1R。在一个实施方案中, 所需的亲和力是在以下范围内的解离常数 (K_D): (i) 约0.1nM至约1,000nM; (ii) 约0.2nM至约500nM、250nM、100nM、50nM、25nM或10nM中的任一个; (iii) 约0.5nM至约250nM、100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个; 或 (iv) 约1nM至约100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个。在一个实施方案中, 所需的亲和力是1nM至10nM的解离常数 (K_D)。在一个实施方案中, 亲和力是通过在25°C和约5.5至约7.4的pH范围下的表面等离子体共振 (SPR) 来确定的。在一个实施方案中, 融合蛋白质对来自小鼠、大鼠和猴的IGF1R的亲和力与对hIGF1R的亲和力相似, 例如, K_D 在对hIGF1R的 K_D 的70%至130%、80%至120%或90%至110%以内。用于测量含BBB的融合蛋白质的 K_D 的示例性SPR测定在US 10,100,117中有描述。

[0187] 本公开的BBB转运融合蛋白质的RB结构域包含抗hIGF1R抗体的重链可变区 (HCVR) 的氨基酸序列。为了促进经遗传修饰的细胞表达融合蛋白质, 在一些实施方案中, RB结构域具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量。RB结构域可衍生自本领域中已知的任何抗IGF1R抗体分子, 包括常规4链抗体、抗原结合片段、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv (双链和单

链(scFv))、微型抗体、双抗体和sdAb。在一个实施方案中, RB实质上由或由sdAb的HCVR氨基酸序列组成。

[0188] 在一个实施方案中, RB结构域包含选自以下组成的组的sdAb中的三个CDR氨基酸序列的集合: US 10,100,117中描述的IGF1R-5sdAb、US 10,106,614中描述的IGF1R-3sdAb和US 10,112,998中描述的IGF1R-5sdAb。这些CDR序列在下表3A中列出。

[0189] 表3A: RB结构域的示例性CDR氨基酸序列

sdAb	CDR1	CDR2	CDR3
IGF1R-5	GRTIDNYA (SEQ ID NO:7)	IDWGDGGX, 其中 X 是 A 或 T (SEQ ID NO:8)	AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO:9)
IGF1R-3	EYPSNFYA (SEQ ID NO:58)	VSRDGLTT (SEQ ID NO:59)	AIVITGVWNKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO:60)
IGF1R-4	GGTVSPTA (SEQ ID NO:61)	ITWSRGTT (SEQ ID NO:62)	AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:63)

[0191] 在一个实施方案中, RB实质上由或由IGF1R-5、IGF1R-3或IGF1R-4, 或这些sdAb中的一者的人源化变体的亲本氨基酸序列组成。在一个实施方案中, RB实质上由或由选自以下组成的组的序列组成:

[0192] (i) $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX_5RQAPGKX_6X_7EX_8VX_9TIDWGDGGX_{10}RYANSVKGRFTISRDNX_{11}KX_{12}TX_{13}Y L Q M N X_{14}LX_{15}X_{16}EDTAVYX_{17}CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT X_{18}VTVSS$, 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是V或S; X_6 是D或G; X_7 是L或R; X_8 是F或W; X_9 是A或S; X_{10} 是A或T; X_{11} 是A或S; X_{12} 是G或N; X_{13} 是M或L; X_{14} 是N或R; X_{15} 是E或R; X_{16} 是P或A; X_{17} 是S或Y; 并且 X_{18} 是Q或L (SEQ ID NO:64);

[0193] (ii) $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5ASEYPSNFYAMSWX_6RQAPGKX_7X_8EX_9VX_{10}GVSRDGLTTLYADSVKGRFTX_{11}SRDNX_{12}KNTX_{13}X_{14}LQMN S X_{15}X_{16}AEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGT X_{17}VTVSS$, 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是V或A; X_6 是F或V; X_7 是E或G; X_8 是R或L; X_9 是F或W; X_{10} 是A或S; X_{11} 是M或I; X_{12} 是A或S; X_{13} 是V或L; X_{14} 是D或Y; X_{15} 是V或L; X_{16} 是K或R; 并且 X_{17} 是Q或L (SEQ ID NO:65); 和

[0194] (iii) $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5X_6SGGTVSPTAMGWX_7RQAPGKX_8X_9EX_{10}VX_{11}HITWSRGTTX_{12}ASSVKX_{13}RFTISRDX_{14}X_{15}KNTX_{16}Y L Q M N S L X_{17}X_{18}EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT X_{19}VTVSS$, 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是A或E; X_6 是V或A; X_7 是V或F; X_8 是G或E; X_9 是L或R; X_{10} 是F或W; X_{11} 是G或S; X_{12} 是V或Y; X_{13} 是D或G; X_{14} 是N或S; X_{15} 是A或S; X_{16} 是L或V; X_{17} 是K或R; X_{18} 是A或S; 并且 X_{19} 是L或Q (SEQ ID NO:66)。

[0195] 在一个实施方案中, RB实质上由或由US 10,100,117、US 10,106,614和US 10,112,998中分别描述的IGF1R-5、IGF1R-3或IGF1R-5的人源化变体中的任一者的氨基酸序列组成。在一个实施方案中, RB实质上由或由选自本文下表3B中所示的亲本或人源化序列的氨基酸序列组成。在一个实施方案中, RB实质上由或由下表3B中所示的IGF1R-5的亲本或人源化氨基酸序列组成。

[0196] 表3B: RB结构域的示例性氨基酸序列。

[0197]

sdAb	亲本序列	示例性人源化序列
IGF1 R-5	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTIDNYAMAWSRQAP GKDREFVATIDWGDGGARYA NSVKGRFTISRDNAGTMYL QMNNLEPEDTAVYSCAMARQ SRVNLDVARYDYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:11)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGL EWVATIDWGDGGTRYANSVKGR FTISRDN SKNTMYLQMNSLRAED TAVYYCAMARQSRVNLDVARYD WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:12)
IGF1 R-3	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLS CVASEYPSNFYAMSWFRQAP GKREFVAGVSRDGLTTLYAD SVKGRFTMSRDNAKNTVDLQ MNSVKAEDTAVYYCAIVITGV WKNVDVNSRSYHYWGQGTQ VT VSS (SEQ ID NO:67)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASEYPSNFYAMSWFRQAPGKER EFVSGVSRDGLTTLYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAIVITGVWKNVDVNSRS YHYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:68)
IGF1 R-4	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLS CEVSGGTVSPTAMGWFRQAP GKREFVGHITWSRGTTTRVAS SVKDRFTISRDSAKNTVYLQM NSLKSEDTAVYYCAASTFLRIL PEESAYTYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:69)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGGTVSPTAMGWVRQAPGKGL EWVGHITWSRGTTTRYASSVKGRF TISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT AVYYCAASTFLRILPEESAYTYW GQGT LVT VSS (SEQ ID NO:70)

[0198] HSA和hIGF1R结合结构域的产生

[0199] AB和RB结构域可衍生自具有本文所述的所需特性的任何抗体或其抗原结合片段。该抗体或抗原结合片段可以是本领域中已知的或可通过本领域中已知的任何方法鉴定。

[0200] 在一些实施方案中,AB和RB结构域中的一者或两者衍生自单结构域Ab。例如,骆驼科动物来源的sdAb缺乏轻链,并且因此它们的抗原结合位点由一个结构域(被称为 V_H H)组成。在鲨鱼中也观察到了sdAb,其被称为 V_{NAR} 。其它sdAb可基于人Ig重链和轻链序列进行工程化。如本文中所用,术语“sdAb”包括通过噬菌体展示或其它技术从任何来源的 V_H 、 V_H H、 V_L 或 V_{NAR} 文库中直接分离的sdAb,重组产生的sdAb,以及通过人源化、亲和力成熟、稳定化、增溶或其它抗体工程化方法对此类sdAb进行进一步修饰而产生的那些sdAb。本公开还涵盖保留亲本sdAb的抗原结合功能和特异性的同源物、衍生物或片段。

[0201] 为了产生与HSA结合的 V_H H sdAb和与hIGF1R结合的 V_H H sdAb,熟练的技术人员可采用本领域中已知的任何方法(例如基本上分别如WO 2019/204925和US 10,100,117中所述)来从用所需抗原免疫的骆驼或其它骆驼科动物的仅有重链的抗体库中产生并筛选噬菌体展示的 V_H H文库。在一个实施方案中,用于使骆驼科动物免疫的IGF1R抗原是前体hIGF1R的片段,例如包含图1中所示序列的氨基酸1至932。在一个实施方案中,抗原hIGF1R片段不含信号肽。

[0202] 衍生自sdAb的AB或RB结构域可包括亲本框架区;可替代地,亲本CDR可被嫁接到其它sdAb的 V_{NAR} 、 V_H H、 V_H 或 V_L 框架区上,或者嫁接到任何来源(例如,人)的其它类型的抗体片段或抗体样分子(Fv、scFv、Fab)或其上可嫁接CDR的具有类似大小和性质的蛋白质的框架区

上(例如,参见Nicaise,M.等人,Protein Sci 13:1882-91 2004)。

[0203] 在一些实施方案中,AB和RB结构域中的一者或两者中的氨基酸序列是亲本可变区的人源化型式(人源化变体)。抗体或抗体片段的人源化包括将序列中的氨基酸用它的如在人共有序列中发现的人对应物替代,而不丧失抗原结合能力或特异性;这种方法降低抗体或其片段在被引入到人受试者中时的免疫原性。可使用本领域已知的任何合适的方法(例如但不限于CDR嫁接和镶饰(veneering))对亲本序列进行人源化。

[0204] 在CDR嫁接过程中,可将一个或多于一个本文定义的CDR融合或嫁接到人可变区(V_H 或 V_L)、另一种人抗体(IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)、抗体片段框架区(Fv、scFv、Fab),或其上可嫁接CDR的具有类似大小和性质的蛋白质。CDR嫁接是本领域中已知的,并且至少在以下中进行了描述:美国专利第6,180,370号、第5,693,761号、第6,054,297号和欧洲专利第626390号。

[0205] 镶饰(Veneering),在本领域中也称为“可变区重表面化(resurfacing)”,涉及对抗体或抗体片段的溶剂暴露位置进行人源化;因此,对CDR构象来说可能重要的包埋的非人源化残基得以保留,同时使针对溶剂暴露区域的免疫反应的可能性最小化。镶饰是本领域中已知的,并且至少在以下中进行了描述:美国专利第5,869,619号、第5,766,886号和第5,821,123号以及欧洲专利第519596号。

[0206] 接头

[0207] BBB转运融合蛋白质可例如,在AB与RB结构域之间和/或在RB结构域与货物部分(例如,治疗性多肽)之间含有一个或多个接头。每个接头应具有足够的长度,以允许连接的多肽单独折叠成具有所需功能活性(例如结合或治疗)的三维结构。此外,每个接头都不应被血清中存在的任何蛋白酶或其它酶裂解。

[0208] 在一些实施方案中,接头是包含至少两个、三个或四个氨基酸并且少于约30个氨基酸(例如少于约25、20、15或10个氨基酸中的任一个)的肽接头。肽接头是本领域中已知的并且本文描述了非限制性实例。

[0209] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。举例来说,源于仅有重链的抗体的铰链区的序列可用作接头。参见例如W01996/34103。

[0210] 合适的接头肽通常包括各种形式的G和/或S残基,示例性接头肽包括GGGG (SEQ ID NO:71)、TGGGG (SEQ ID NO:72)、GGSSGGSGSSSGSGSGSSG (SEQ ID NO:73)、(GGSS) $_n$ (SEQ ID NO:74)、(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:13)、(SGGGG) $_n$ (SEQ ID NO:75)和GGGG(SGGGG) $_n$ (SEQ ID NO:76),其中“ n ”在每种情况下通常是1与10之间的数字,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,条件是不超过约40个氨基酸的最大长度。另一个示例性肽接头是SKPTCPPPELLGGPSVFIFPPK (SEQ ID NO:77)。

[0211] 在一个实施方案中,融合蛋白质包含两个肽接头L1和L2,其中肽接头L1位于AB与RB之间,并且L2位于RB与货物多肽之间。在一个实施方案中,L1和L2中的每一者的长度在约15与30个氨基酸之间,或约20与25个氨基酸之间。L1和L2可具有相同或不同的氨基酸序列。在一个实施方案中,每个L1和L2均独立地实质上由或由以下组成:(GGGGS) $_4$ (SEQ ID NO:14)或(GGGGS) $_5$ (SEQ ID NO:78)。在一个实施方案中,L1和L2中的每一者均实质上由或由以下组成:(GGGGS) $_4$ 。

[0212] 治疗性和诊断性货物

[0213] 货物部分可以是可联接或连接至hIGF1R结合结构域的任何治疗性或诊断性分子。

[0214] 在一个实施方案中,治疗性分子是多肽,例如细胞因子、酶、生长因子,或抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,该多肽具有可用于治疗哺乳动物(例如,人)的神经系统病症的活性。在一个实施方案中,神经系统病症选自以下组成的组:具有神经系统表现的LSD(nLSD)、阿尔茨海默病(AD)、共济失调(例如,遗传性共济失调,如弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia))、亨廷顿病、中风、痴呆、肌营养不良症(MD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、囊性纤维变性、安格尔曼综合征(Angelman's syndrome)、利德尔综合征(Liddle syndrome)、帕金森病、皮克病、佩吉特病、精神分裂症、抑郁症、脑炎、朊病毒病、癌症和创伤性脑损伤。

[0215] 在一个实施方案中,治疗性分子是酶。在一个实施方案中,该酶在LSD中是缺乏的,例如,Edelman,M.J.And和Maegawa,G.H.B.,Frontiers in Molecular Biosciences,第7卷,文章559804(2020年11月12日)的表1中列出的缺乏的酶中的任一种。在一个实施方案中,该酶是IDUA、IDS、SGSH、GLA或GAA。在一个实施方案中,LSD是MPS-1并且该酶是IDUA。在一个实施方案中,该酶是IDS。在一个实施方案中,该酶不是IDS。

[0216] 在一个实施方案中,治疗性分子是特异性结合至脑中的靶蛋白质(例如,抗原)的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,靶蛋白质是Tau蛋白质(例如,顺式P-tau)、A β 、BACE1或其剪接同种型、人表皮生长因子受体(2)(HER2)、载脂蛋白质E4(ApoE4)、 α -突触核蛋白、CD20、朊病毒蛋白质(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin早老素1、早老素2、 γ 分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样蛋白前体蛋白质(APP)、p75神经生长因子受体(p75NTR)、干扰素 γ 、白细胞介素-1受体(IL-1R)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素6受体(IL6R)、白细胞介素-12、白细胞介素-23、TNF受体(TNFR1)、白细胞介素1 β (IL1 β)、半胱天冬酶6、白细胞介素-17(IL-17)、CTLA-4、程序性死亡受体1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、TNF- α 、血管内皮生长因子(VEGF)或VEGF受体(VEGFR)。

[0217] 在一个实施方案中,治疗性分子是细胞因子或生长因子,例如免疫调节细胞因子,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- β 、神经生长因子、胶质细胞系来源的神经营养因子(GDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、成纤维细胞生长因子-2(FGF2)、表皮生长因子(EGF)或转化生长因子(TGF)- β 2。

[0218] 经遗传修饰的细胞

[0219] 上述BBB转运融合蛋白质中的任一种都可由一种或多种被遗传修饰成表达并分泌融合蛋白质的哺乳动物细胞表达。一种或多种经遗传修饰的细胞可衍生自多种不同的哺乳动物细胞类型(例如,人细胞),包括上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、间充质干细胞、角质形成细胞和干细胞,例如胚胎干细胞或诱导型多能干细胞。示例性细胞类型包括WO 2017/075631中所述的细胞类型。在一些实施方案中,该细胞衍生自下表4中所示的细胞系。

[0220] 表4:示例性细胞系

[0221]	细胞系	细胞类型	胚层	商业来源
	ARPE-19	上皮(视网膜)	外胚层	ATCC (CRL-2302)
	BJ	成纤维细胞(包皮)	外胚层	ATCC (CRL-2522)
	CCD-841-CoN	上皮(结肠)	内胚层	ATCC (CRL-1790)
	HaCat	角质形成细胞	外胚层	Addexbio (T0020001)
	HHSEC	内皮(肝窦)	内胚层	Sciencellonline.com (#5000)
	Huv-EC-C	内皮(胚胎脐带)	中胚层	ATCC (CRL-1730)
	MCF-10A	上皮(乳腺)	外胚层	ATCC (CRL-10317)
	MRC-5	成纤维细胞(肺)	中胚层	ATCC (CCL-171)
	MSC, 人	间充质(骨髓)	中胚层	ATCC (PCS-500-012)
	MSC, 小鼠	间充质(骨髓)	中胚层	Cyagen (MU BMX-01001)
	WS-1	成纤维细胞(皮	外胚层	ATCC (CRL-1502)
[0222]		肤)		
	293F	上皮(胚肾)	中胚层	Thermo Fisher (R790007)

[0223] 在一个实施方案中,本文所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞中的任一种都衍生自RPE细胞,例如ARPE-19细胞。在一个实施方案中,经遗传修饰的ARPE-19细胞包含本文所述的表达盒、转座子和多核苷酸中的任一者。

[0224] 可使用本领域中已知的多种遗传工程化技术中的任一种将细胞遗传修饰成表达并分泌所需的BBB转运融合蛋白质。例如,可用包含编码所需融合蛋白质的一个或多个外源核苷酸序列的表达载体转染细胞,该一个或多个外源核苷酸序列可操作地连接至基因表达所必需或可用于基因表达的控制元件,例如启动子、核糖体结合位点、增强子、polyA信号等。在一些实施方案中,外源核苷酸序列是稳定整合到亲本细胞的基因组中的转录单元的一部分。

[0225] 在一个实施方案中,外源序列包括编码融合蛋白质的分泌信号序列的核苷酸序列。在一个实施方案中,信号序列来自天然分泌的蛋白质。在一个实施方案中,信号序列是MELGLSWVLAALLQGVQA (SEQ ID NO:79)。在一些实施方案中,信号序列实质上由下表5中所示的氨基酸序列组成。

[0226] 表5:示例性分泌信号肽序列

蛋白质	氨基酸序列
白蛋白	MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO:80)
κ 前导序列	MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO:81)
[0227] 纤溶酶原激活物抑制因子 1	MQMSPALTCLVLGLALVFGEGSA (SEQ ID NO:82)
血小板反应蛋白-1	MGLAWGLGVFLMHVCGT (SEQ ID NO:83)
纤连蛋白	MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKR (SEQ ID NO:84)
[0228] 基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白质 (HSPG2)	MGWRAAGALLLALLLHGRLLA (SEQ ID NO:85)
集聚素(Agrin)	MAGRSHPGPLRPLLPLLVAACVLPGAGG (SEQ ID NO:86)

[0229] 用于例如作为水凝胶胶囊中的多个细胞在本文所述的设备、组合物和方法中使用的经遗传修饰的哺乳动物细胞可处于细胞周期的各个阶段。在一些实施方案中,多个经遗传修饰的细胞中的至少一个细胞正在经历细胞分裂。细胞分裂可使用本领域中的任何已知方法来测量,例如,如在DeFazio A等人(1987) J Histochem Cytochem 35:571-577和Dolbeare F等人(1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:5573-5577中所描述,其中的每一者均通过引用以其整体并入。在一个实施方案中,至少1%、2%、3%、4%、5%、10%或20%的细胞正在经历细胞分裂,例如,如通过5-乙炔基-2'脱氧尿苷(EdU)测定或5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)测定所确定。在一些实施方案中,通过显微术(例如荧光显微术(例如延时或纺锤体形成的评价)或流式细胞术)对细胞增殖进行可视化或定量。在一些实施方案中,多个经遗传修饰的细胞中没有细胞正在经历细胞分裂并且处于静止状态。在一个实施方案中,少于1%、2%、3%、4%、5%、10%或20%的细胞正在经历细胞分裂,5-乙炔基-2'脱氧尿苷(EdU)测定、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)测定、显微术(例如,荧光显微术(例如,延时或纺锤体形成的评价)或流式细胞术)。

[0230] 在一个实施方案中,多个经遗传修饰的细胞中的至少50%、60%、70%、80%、90%或更多的经遗传修饰的细胞是有活力的。细胞活力可使用本领域中的任何已知方法来测量,例如,如在Assay Guidance Manual (Sittapalam, G.S.等人,编辑)中的Riss, T.等人(2013) "Cell Viability Assays"中所描述。例如,可通过ATP测定、5-乙炔基-2'脱氧尿苷(EdU)测定、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)测定来测量或定量细胞活力。在一些实施方案中,通过显微术(例如荧光显微术(例如延时或纺锤体形成的评价)或流式细胞术)对细胞活力进行可视化或定量。在一个实施方案中,多个经遗传修饰的细胞中的至少80%的工程化细胞是有活力的,例如,如通过ATP测定、5-乙炔基-2'脱氧尿苷(EdU)测定、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)测定、显微术(例如,荧光显微术(例如,延时或纺锤体形成的评价)或流式细胞术所

确定。

[0231] 可使用本领域技术人员已知的标准技术(如组织学、显微术和各种功能测定)来评估本文所述的任何参数。

[0232] 可植入细胞包封设备

[0233] 可将本文所述的经遗传修饰的细胞或多个此类细胞掺入到可植入设备中,以用于向患有CNS疾病或疾患的受试者(例如患有LSD(例如MPS-I)的患者)提供治疗性或诊断性货物。

[0234] 本公开的可植入设备包括至少一个防止免疫细胞接触设备内部所含的细胞的屏障。屏障的至少一部分需要是足够多孔的,以允许由细胞表达并分泌的蛋白质(例如融合蛋白质)离开设备。本领域中已知的多种设备构造都是合适的。

[0235] 该设备(例如,颗粒)可具有适于在植入到预期目标位置中后支持所含的细胞的活力和生产力的任何构造和形状。作为非限制性示例,设备形状可以是圆柱形、矩形、圆盘形、卵形、星形或球形。设备可由网状或嵌套结构构成。在一些实施方案中,设备能够防止超过一定尺寸的材料穿过孔隙或开口。在一些实施方案中,设备(例如,颗粒)能够阻止大于50kD、75kD、100kD、125kD、150kD、175kD、200kD、250kD、300kD、400kD、500kD、750kD或1,000kD的材料穿过。

[0236] 在一个实施方案中,设备是宏包封(macroencapsulation)设备。宏设备(macrodvice)的非限制性实例在以下中进行了描述:WO 2019/068059、WO 2019/169089、美国专利第9,526,880号、第9,724,430号和第8,278,106号;欧洲专利第EP742818B1号,以及Sang,S.和Roy,S.,Biotechnol.Bioeng.113(7):1381-1402(2016)。

[0237] 在一个实施方案中,设备是具有一个或多个含细胞隔室的宏设备。具有两个或更多个含细胞隔室的设备可被构造为产生两种或更多种蛋白质,例如,表达融合蛋白质的细胞将被放置在一个隔室中,并且表达不同蛋白质(例如,可缓和被靶向的CNS疾病或疾患的一种或多种症状的治疗性蛋白质)的细胞将被放置在分开的隔室中。WO 2018/232027描述了具有在微制造体(micro-fabricated body)内形成并且被多孔膜覆盖的多个含细胞隔室的设备。

[0238] 在一个实施方案中,设备被构造为细的、柔性的股线,如美国专利第10,493,107号中所述。此股线包括基底、围绕基底的内聚合物涂层和围绕内聚合物涂层的外水凝胶涂层。表达蛋白质的细胞位于外涂层中。

[0239] 在一些实施方案中,设备(例如,颗粒)具有最大线性尺寸(LLD),例如为至少约0.5毫米(mm)、优选约1.0mm、约1.5mm或更大的平均直径或尺寸。在一些实施方案中,设备的直径或尺寸可大至10mm。例如,本文所述的设备或颗粒在0.5mm至10mm、1mm至10mm、1mm至8mm、1mm至6mm、1mm至5mm、1mm至4mm、1mm至3mm、1mm至2mm、1mm至1.5mm、1.5mm至8mm、1.5mm至6mm、1.5mm至5mm、1.5mm至4mm、1.5mm至3mm、1.5mm至2mm、2mm至8mm、2mm至7mm、2mm至6mm、2mm至5mm、2mm至4mm、2mm至3mm、2.5mm至8mm、2.5mm至7mm、2.5mm至6mm、2.5mm至5mm、2.5mm至4mm、2.5mm至3mm、3mm至8mm、3mm至7mm、3mm至6mm、3mm至5mm、3mm至4mm、3.5mm至8mm、3.5mm至7mm、3.5mm至6mm、3.5mm至5mm、3.5mm至4mm、4mm至8mm、4mm至7mm、4mm至6mm、4mm至5mm、4.5mm至8mm、4.5mm至7mm、4.5mm至6mm、4.5mm至5mm、5mm至8mm、5mm至7mm、5mm至6mm、5.5mm至8mm、5.5mm至7mm、5.5mm至6mm、6mm至8mm、6mm至7mm、6.5mm至8mm、6.5mm至7mm、7mm

至8mm或7.5mm至8mm的尺寸范围内。

[0240] 在一些实施方案中,本公开的设备(例如,颗粒、胶囊)包括至少一个孔隙或开口,例如以允许材料自由流动。在一些实施方案中,设备的平均孔隙尺寸是在约0.1 μm 至约10 μm 之间。例如,平均孔隙尺寸可以是在0.1 μm 至10 μm 、0.1 μm 至5 μm 、0.1 μm 至2 μm 、0.15 μm 至10 μm 、0.15 μm 至5 μm 、0.15 μm 至2 μm 、0.2 μm 至10 μm 、0.2 μm 至5 μm 、0.25 μm 至10 μm 、0.25 μm 至5 μm 、0.5 μm 至10 μm 、0.75 μm 至10 μm 、1 μm 至10 μm 、1 μm 至5 μm 、1 μm 至2 μm 、2 μm 至10 μm 、2 μm 至5 μm 或5 μm 至10 μm 之间。在一些实施方案中,设备的平均孔隙尺寸是在约0.1 μm 至10 μm 之间。在一些实施方案中,设备的平均孔隙尺寸是在约0.1 μm 至5 μm 之间。在一些实施方案中,设备的平均孔隙尺寸是在约0.1 μm 至1 μm 之间。

[0241] 在一些实施方案中,设备包括半透性、生物相容性膜,该膜围绕被包封在聚合物组合物(例如,藻酸盐水凝胶)中的经遗传修饰的细胞。选择膜孔隙尺寸以允许氧气和其它对细胞存活和功能重要的分子移动通过半透膜,同时阻止免疫细胞穿出孔隙。在一个实施方案中,半透膜具有小于1000kD或在50-700kD之间、70-300kD之间,或70-150kD之间,或70与130kD之间的截留分子量。

[0242] 在一个实施方案中,设备可含有含细胞隔室,该含细胞隔室被由无细胞生物相容性材料形成的屏障隔室围绕,如Ma,M等人,Adv.Healthc Mater.,2(5):667-672(2012)中描述的核-壳微胶囊。此种屏障隔室可与或不与半透膜一起使用。

[0243] 本公开的设备的一个或多个含细胞隔室中的细胞可被包封在聚合物组合物中。聚合物组合物可包含一种或多种形成水凝胶的聚合物。除了一个或多个含细胞隔室中的聚合物组合物之外,设备(例如,宏设备、颗粒、水凝胶胶囊)还可包含诸如金属、金属合金、陶瓷、聚合物、纤维、惰性材料以及其组合的材料或由该材料形成。设备可完全由一种类型的材料制成,或者可在含细胞隔室和任何其它隔室内包含其它材料。

[0244] 在一些实施方案中,设备包含金属或金属合金。在一个实施方案中,设备中的隔室中的一个或多个隔室(例如第一隔室、第二隔室或所有隔室)包含金属或金属合金。示例性的金属或金属合金包括钛和钛族合金(titanium group alloy)(例如,镍钛诺(nitinol)、镍钛合金、热记忆合金材料)、铂、铂族合金、不锈钢、钽、钯、锆、铌、钼、镍-铬、铬钼合金或某些钴合金(例如,钴-铬和钴-铬-镍合金,例如ELGILOY®和PHYNOX®)。例如,金属材料可以是316级不锈钢(SS 316L)(包括Fe、<0.3% C、16%-18.5% Cr、10%-14% Ni、2%-3% Mo、<2% Mn、<1% Si、<0.45% P和<0.03% S)。在含金属的设备中,金属的量(例如,以重量%计,实际重量)可以是至少5%,例如至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多,例如w/w;小于20%,例如,小于20%、15%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%或更少。

[0245] 在一些实施方案中,设备包括陶瓷。在一个实施方案中,设备中的隔室中的一个或多个隔室(例如第一隔室、第二隔室或所有隔室)包括陶瓷。示例性的陶瓷材料包括过渡元素的氧化物、碳化物或氮化物,如氧化钛、氧化钨、氧化铌、氧化铬、氧化铝和氧化锆。也可使用基于硅的材料,如二氧化硅。在含陶瓷的设备中,陶瓷的量(例如,以重量%计,实际重量)可以是至少5%,例如至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多,例如w/w;小于20%,例如,小于20%、15%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%或更少。

[0246] 在一些实施方案中,设备具有两个水凝胶隔室,其中内部含细胞隔室完全被第二(例如,屏障)隔室围绕。在一个实施方案中,第二隔室的内边界与第一隔室的外边界形成界面。在此类实施方案中,第二(外)隔室的厚度意指第二隔室的外边界与介于两个隔室之间的界面之间的平均距离,例如,在外隔室中从视觉上观察到的最薄点和最厚点中的每一者处测量的距离的平均值。在一些实施方案中(例如,设备的直径是约1.5mm),外隔室的最薄距离和最厚距离分别是在25与110微米(μm)之间以及270 μm 与480 μm 之间。在一些实施方案中,外隔室的厚度大于约10纳米(nm),优选100nm或更大,并且可大至1毫米(mm)。例如,本文所述的水凝胶胶囊设备中的外隔室的厚度(例如,平均距离)可以是10nm至1mm、100nm至1mm、500nm至1毫米、1微米(μm)至1mm、1 μm 至1mm、1 μm 至500 μm 、1 μm 至250 μm 、1 μm 至1mm、5 μm 至500 μm 、5 μm 至250 μm 、10 μm 至1mm、10 μm 至500 μm 或10 μm 至250 μm 。在一些实施方案中,外隔室的厚度(例如,平均距离)是100nm至1mm、在1 μm 与1mm之间、在1 μm 与500 μm 之间或在5 μm 与1mm之间。在一些实施方案中,外隔室的厚度(例如,平均距离)是在约50 μm 与约100 μm 之间。在一些实施方案中(例如,设备的直径是约1.5mm),外隔室的厚度(例如,平均距离)是在约180 μm 与260 μm 之间或在约310 μm 与440 μm 之间。

[0247] 在双隔室水凝胶胶囊设备的一些实施方案中,含细胞的内部隔室和外隔室的平均孔隙尺寸基本上相同。在一些实施方案中,内部隔室和第二隔室的平均孔隙尺寸相差约1.5%、2%、5%、7.5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多。在一些实施方案中,设备的平均孔隙尺寸(例如,第一隔室的平均孔隙尺寸和/或第二隔室的平均孔隙尺寸)取决于许多因素,如每个隔室内的一种或多种材料以及式(III)化合物的存在和密度。

[0248] 在一些实施方案中,一个或多个含细胞隔室中的聚合物组合物包含多糖或其它形成水凝胶的聚合物(例如,藻酸盐、透明质酸盐或软骨素)。在一些实施方案中,聚合物是藻酸盐,该藻酸盐是由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)制成的多糖。在一些实施方案中,藻酸盐具有低分子量(例如,<75kDa的近似分子量)和 ≥ 1.5 的G:M比率,(ii)中等分子量藻酸盐,例如具有75-150kDa的近似分子量约和 ≥ 1.5 的G:M比率,(iii)高分子量藻酸盐,例如具有150kDa-250kDa的近似MW和 ≥ 1.5 的G:M比率,(iv)或这些藻酸盐中的两种或更多种的混合物。在一些实施方案中,一个或多个含细胞隔室进一步包含至少一种细胞结合物质(CBS),例如W02020069429中描述的细胞结合肽(CBP)或细胞结合多肽(CBPP)。

[0249] 在一些实施方案中,一个或多个含细胞隔室包含用接头-细胞结合肽部分(例如GRGD或GRGDSP)共价修饰的藻酸盐。在一个实施方案中,一个或多个含细胞隔室中的细胞结合肽密度(如通过例如如W02020198695中所述的燃烧分析确定的氮%)是至少0.05%、0.1%、0.2%或0.3%,但小于4%、3%、2%或1%。在一个实施方案中,含细胞隔室中接头-CBP的总密度是约0.1至约1.0微摩尔的CBP/g CBP-聚合物(例如,溶液中用GRGD(SEQ ID NO:88)或GRGDSP(SEQ ID NO:89)共价修饰的MMW-藻酸盐),如通过定量肽缀合测定,例如W02020198695中描述的测定所确定的。在一个实施方案中,接头-CBP是GRGDSP并且藻酸盐具有75kDa至150kDa的分子量和大于或等于1.5的G:M比率。在一个实施方案中,含细胞隔室还包含分子量为75kDa至150kDa且G:M比率大于或等于1.5的未经修饰的藻酸盐。

[0250] 设备可形成制剂(例如组合物)中的多个基本上相同的设备的一部分。在一些实施方案中,制剂中的设备(例如,颗粒、水凝胶胶囊)具有约0.5mm至约8mm之间的平均直径或尺

寸。在一些实施方案中,制剂中的设备的平均直径或尺寸在约0.5mm至约4mm之间或约0.5mm至约2mm之间。在一些实施方案中,制剂中的设备是两隔室水凝胶胶囊,并且具有约0.7mm至约1.3mm,或约1.2mm至约1.8mm的平均直径或尺寸。

[0251] 在一些实施方案中,设备的表面包含能够在植入受试者中后减轻FBR的化合物,如本文下文所述的去纤维化化合物。对于包括围绕含细胞隔室的屏障隔室的设备,去纤维化化合物可以共价修饰设置在整个屏障隔室和任选地整个含细胞隔室中的聚合物。

[0252] 在一些实施方案中,设备中的一个或多个隔室包括去纤维化聚合物,例如,共价衔接至聚合物的式(III)的去纤维化化合物。在一个实施方案中,去纤维化聚合物中的一些或全部单体用相同的式(III)化合物修饰。在一些实施方案中,去纤维化聚合物中的一些或全部单体用不同的式(III)化合物修饰。在设备为2隔室水凝胶胶囊的一些实施方案中,去纤维化聚合物仅存在于外屏障隔室中。

[0253] 设备中的一个或多个隔室可包括未经修饰的聚合物,该未经修饰的聚合物与设备中存在的任何去纤维化聚合物中的聚合物相同或不同。在一个实施方案中,设备中的第一隔室、第二隔室或所有隔室均包括未经修饰的聚合物。

[0254] 设备中的经修饰的聚合物和未经修饰的聚合物中的每一者均可以是线性、支化或交联聚合物,或者是具有选定分子量范围、聚合度、粘度或熔体流动速率的聚合物。支化聚合物可包括以下类型中的一种或多种:星形聚合物、梳形聚合物、刷状聚合物、树枝化聚合物、梯状聚合物(ladder)和树状聚合物(dendrimer)。聚合物可以是热敏性聚合物,例如凝胶(例如,在暴露于热量或某一温度后变成固体或液体)或可光交联的聚合物。示例性聚合物包括聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙炔、聚(氯乙烯)(PVC)、聚烯烃共聚物、聚(聚氨酯)、聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺和聚甲基丙烯酰胺、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚酯、聚硅氧烷、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚醚、聚(原酸酯)、聚(碳酸酯)、聚(羟基烷酸酯)、多氟烃、PEEK®、Teflon®(聚四氟乙烯,PTFE)、PEEK、硅酮、环氧树脂、Kevlar®、Dacron®(由乙二醇和对苯二甲酸获得的缩聚物)、聚乙二醇、尼龙、聚烯烃、酚醛树脂、天然和合成弹性体、粘合剂和密封剂、聚烯烃、聚砜、聚丙烯腈、生物聚合物如多糖和天然乳胶、胶原蛋白、纤维素聚合物(例如烷基纤维素等)、聚乙二醇和甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)、多糖、聚(乙醇酸)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乳酸乙醇酸)(PLGA)、聚二氧杂环己酮(PDA),或外消旋聚(乳酸)、聚碳酸酯(例如,聚酰胺(例如,尼龙))、氟塑料、碳纤维、琼脂糖、藻酸盐、壳聚糖、以及它们的共混物或共聚物。在含聚合物的设备中,聚合物的量(例如,以设备的重量%计,聚合物的实际重量)可以是至少5%,例如至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多,例如w/w;小于20%,例如,小于20%、15%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%或更少。

[0255] 在一些实施方案中,设备中的经修饰的聚合物和未经修饰的聚合物中的一种或多种包含聚乙烯。示例性聚乙烯包括超低密度聚乙烯(ULDPE)(例如,具有范围为0.890至0.905g/cm³的密度的聚合物,含有共聚单体);极低密度聚乙烯(VLDPE)(例如,具有范围为0.905至0.915g/cm³的密度的聚合物,含有共聚单体);线性低密度聚乙烯(LLDPE)(例如,具有范围为0.915至0.935g/cm³的密度的聚合物,含有共聚单体);低密度聚乙烯(LDPE)(例如,具有范围为约0.915至0.935g/m³的密度的聚合物);中等密度聚乙烯(MDPE)(例如,具有范围为0.926至0.940g/cm³的密度的聚合物,可含有或可不含共聚单体);高密度聚乙烯

(HDPE) (例如,具有范围为0.940至0.970g/cm³的密度的聚合物,可含有或可不含有共聚单体)和聚乙二醇。

[0256] 在一些实施方案中,设备中的经修饰的聚合物和未经修饰的聚合物中的一种或多种包含聚丙烯。示例性聚丙烯包括均聚物、无规共聚物(同相共聚物)和抗冲共聚物(异相共聚物),例如,如McKeen, Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices, 3-Plastics Used in Medical Devices, (2014):21-53中所描述。

[0257] 在一些实施方案中,设备中的经修饰的聚合物和未经修饰的聚合物中的一种或多种包含聚丙烯。示例性聚苯乙烯包括通用或晶体聚苯乙烯(PS或GPPS)、高抗冲聚苯乙烯(HIPS)和间同立构聚苯乙烯(SPS)。

[0258] 在一些实施方案中,经修饰的聚合物和未经修饰的聚合物中的一种或多种包含热塑性弹性体(TPE)。示例性TPE包括(i) TPA-聚酰胺TPE,其包含交替的硬链段和软链段的嵌段共聚物,其中在硬嵌段中具有酰胺化学键联并且在软嵌段中具有醚和/或酯键联;(ii) TPC-共聚酯TPE,其由交替的硬链段和软链段的嵌段共聚物组成,主链中的化学键联是酯和/或醚;(iii) TPO-烯烃TPE,其由聚烯烃和常规橡胶的共混物组成,该共混物中的橡胶相具有很少的交联或没有交联;(iv) TPS-苯乙烯类TPE,其至少由苯乙烯和特定二烯的三嵌段共聚物组成,其中两个末端嵌段(硬嵌段)是聚苯乙烯,并且内部嵌段(一个或多个软嵌段)是聚二烯或氢化聚二烯;(v) TPU-氨基甲酸酯TPE,其由交替的硬链段和软链段的嵌段共聚物组成,其中在硬嵌段中具有氨基甲酸酯化学键联并且在软嵌段中具有醚、酯或碳酸酯键联或它们的混合物;(vi) TPV-热塑性橡胶硫化橡胶,其由热塑性材料和常规橡胶的共混物组成,其中橡胶在共混和混合步骤过程中通过动态硫化过程交联;以及(vii) TPZ-未分类的TPE,其包含除TPA、TPC、TPO、TPS、TPU和TPV中分组的组合物或结构以外的任何组合物或结构。

[0259] 在一些实施方案中,未经修饰的聚合物是未经修饰的藻酸盐。在一些实施方案中,藻酸盐是高古洛糖醛酸(G)藻酸盐,并且包含大于约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多古洛糖醛酸(G)。在一些实施方案中,藻酸盐是高甘露糖醛酸(M)藻酸盐,并且包含大于约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多甘露糖醛酸(M)。在一些实施方案中,M:G的比率是约1。在一些实施方案中,M:G的比率小于1。在一些实施方案中,M:G的比率大于1。在一个实施方案中,未经修饰的藻酸盐具有150kDa-250kDa的分子量和 ≥ 1.5 的G:M比率。

[0260] 在一些实施方案中,去纤维化聚合物包含用式(III)化合物化学修饰的藻酸盐。去纤维化聚合物中的藻酸盐可与设备中存在的任何未经修饰的藻酸盐相同或不同。在一个实施方案中,去纤维化藻酸盐中式(III)化合物的密度(例如缀合的量)在约4.0%与约8.0%的氮之间、约5.0%与约7.0%的氮之间或约6.0%与约7.0%的氮之间(例如,如通过针对氮百分比的燃烧分析所确定的)。在一个实施方案中,化合物101的量产生约0.5%至2%至4% N、约4%至6% N、约6%至8%或约8%至10% N的N%增加(与未经修饰的藻酸盐相比),其中N%是通过燃烧分析来确定并且对应于经修饰的藻酸盐中化合物101的量。

[0261] 在其它实施方案中,去纤维化藻酸盐中式(III)化合物(例如化合物101)的密度(例如浓度)被定义为%w/w,例如,如通过合适的定量胺缀合测定(例如通过W02020069429中描述的测定)确定的溶液(例如盐水)中的胺的重量/去纤维化藻酸盐的重量的%,并且在

某些实施方案中,式(III)化合物(例如化合物101)的密度在约1.0%w/w与约3.0%w/w之间、约1.3%w/w与约2.5%w/w之间或约1.5%w/w与2.2%w/w之间。

[0262] 在含藻酸盐的设备中,经修饰的和未经修饰的藻酸盐的量(例如,以设备的重量%计,藻酸盐的实际重量)可以是至少5%,例如至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多,例如w/w;小于20%,例如,小于20%、15%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%或更少。

[0263] 去纤维化聚合物中的藻酸盐可使用本领域已知的任何合适的方法用式(III)的化合物进行化学修饰。例如,可将藻酸盐羧酸部分激活用于与一种或多种胺官能化的化合物偶联以获得用式(III)化合物修饰的藻酸盐。可将藻酸盐聚合物溶解于水(30mL/克聚合物)中,并用活化剂(例如,2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(0.5当量))和碱(例如,N-甲基吗啉(1当量))处理。可向此混合物中添加式(III)化合物于乙腈(0.3M)中的溶液。可将反应物温热至55℃保持16小时,然后冷却至室温并通过旋转蒸发温和浓缩,然后可将残余物溶解在例如水中。然后可将混合物过滤,例如通过氨基改性的硅胶(Silicycle)床过滤,并用水洗涤滤饼。然后可将所得溶液用水透析(10,000MWCO膜)24小时,例如更换水两次。可例如通过冻干将所得溶液浓缩,以得到所需的经化学修饰的藻酸盐。可使用本领域中已知的,例如,如WO 2021/119522、WO 2019/195055、WO 2018/067615、WO 2017/075631、WO 2016/019391和WO 2012/167223中的任一者中所述的任何合适的方法用式(III)化合物对去纤维化聚合物中的藻酸盐进行化学修饰。

[0264] 在一个实施方案中,设备包括至少一个含细胞隔室,并且在一些实施方案中含有两个、三个、四个或更多个含细胞隔室。在一个实施方案中,每个含细胞隔室均包括多个细胞(例如,活细胞),并且当设备被植入受试者中时,这些隔室中的至少一个隔室中的细胞能够表达并分泌BBB转运融合蛋白质。

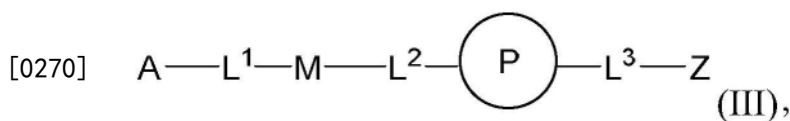
[0265] 在一个实施方案中,含细胞隔室中的所有细胞都衍生自单一亲本细胞类型或至少两种不同亲本细胞类型的混合物。在一个实施方案中,含细胞隔室中的所有细胞都衍生自相同的亲本细胞类型,但第一多个衍生的细胞被工程化成表达BBB转运融合蛋白质,并且第二多个衍生的细胞被工程化成表达不同的治疗性蛋白质。在具有两个或更多个含细胞隔室的设备中,细胞和由此产生的一种或多种蛋白质在每个含细胞隔室中可相同或不同。在一些实施方案中,所有含细胞隔室都被单个屏障隔室围绕。在一些实施方案中,屏障隔室基本上不含细胞。

[0266] 在一个实施方案中,待掺入到本文所述的设备(例如,水凝胶胶囊)中的细胞在被包封于该设备内之前以细胞悬浮液的形式制备。悬浮液中的细胞可采取单细胞的形式(例如,来自单层细胞培养物),或以另一种形式提供,例如设置在微载体(例如,珠或基质)上或作为细胞的三维聚集体(例如,细胞簇或球状体)。细胞悬浮液可包含多个细胞簇(例如,作为球状体)或微载体。

[0267] 除了由包封的细胞分泌的融合蛋白质之外,设备(例如,胶囊、颗粒)还可包含一种或多种不由该细胞表达的外源剂,并且可包含例如核酸(例如RNA或DNA分子)、蛋白质(例如,激素、酶(例如,葡萄糖氧化酶、激酶、磷酸酶、加氧酶、氢化酶、还原酶)、抗体、抗体片段、抗原或表位)、蛋白质或多肽的活性或非活性片段、小分子或药物。在一个实施方案中,设备被构造成释放这样的外源剂。

[0268] 去纤维化的- (例如,减轻FBR的) 化合物

[0269] 在一些实施方案中,本文所述的设备包括至少一种式(III)化合物:



[0271] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0272] A是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-、-N(R^C)-、-N(R^C)C(O)-、-C(O)N(R^C)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烯基)-、-N(R^C)N(R^D)-、-NCN-、-C(=N(R^C)(R^D))O-、-S-、-S(O)_x-、-OS(O)_x-、-N(R^C)S(O)_x-、-S(O)_xN(R^C)-、-P(R^F)_y-、-Si(OR^A)₂-、-Si(R^G)(OR^A)-、-B(OR^A)-或金属,其中的每一者均任选地连接至连接基团(例如,本文所述的连接基团)且任选地被一个或多个R¹取代;

[0273] L¹和L³中的每一者均独立地为键、烷基或杂烷基,其中每个烷基和杂烷基均任选地被一个或多个R²取代;

[0274] L²是键;

[0275] M是不存在、烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R³取代;

[0276] P是不存在、环烷基、杂环基,或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R⁴取代;

[0277] Z是氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、-OR^A、-C(O)R^A、-C(O)OR^A、-C(O)N(R^C)(R^D)、-N(R^C)C(O)R^A、-N(R^C)(R^D)、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁵取代;

[0278] 每个R^A、R^B、R^C、R^D、R^E、R^F和R^G均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、叠氮基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁶取代;

[0279] 或者R^C和R^D与它们所附接至的氮原子一起形成任选地被一个或多个R⁶取代的环(例如,5-7元环);

[0280] 每个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、叠氮基、氧代基、-OR^{A1}、-C(O)OR^{A1}、-C(O)R^{B1}、-OC(O)R^{B1}、-N(R^{C1})(R^{D1})、-N(R^{C1})C(O)R^{B1}、-C(O)N(R^{C1})、SR^{E1}、S(O)_xR^{E1}、-OS(O)_xR^{E1}、-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}、-S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})、-P(R^{F1})_y、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

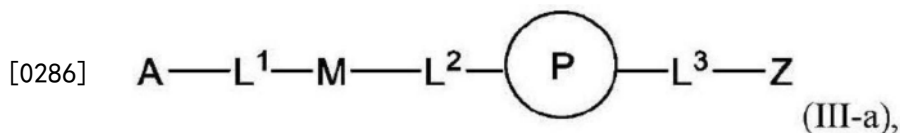
[0281] 每个R^{A1}、R^{B1}、R^{C1}、R^{D1}、R^{E1}和R^{F1}均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

[0282] 每个R⁷均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、氧代基、羟基、环烷基或杂环基;

[0283] x是1或2;并且

[0284] y是2、3或4。

[0285] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(III-a)化合物:



[0287] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0288] A是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-、-N(R^C)-、-N(R^C)C(O)-、-C(O)N(R^C)-、-N(R^C)N(R^D)-、N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烯基)-、-NCN-、-C(=N(R^C)(R^D))O-、-S-、-S(O)_x-、-OS(O)_x-、-N(R^C)S(O)_x-、-S(O)_xN(R^C)-、-P(R^F)_y-、-Si(OR^A)₂-、-Si(R^G)(OR^A)-、-B(OR^A)-或金属,其中的每一者均任选地连接至附接基团(例如,本文所述的附接基团)且任选地被一个或多个R¹取代;

[0289] L¹和L³中的每一者均独立地为键、烷基或杂烷基,其中每个烷基和杂烷基均任选地被一个或多个R²取代;

[0290] L²是键;

[0291] M是不存在、烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R³取代;

[0292] P是任选地被一个或多个R⁴取代的杂芳基;

[0293] Z是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被一个或多个R⁵取代;

[0294] 每个R^A、R^B、R^C、R^D、R^E、R^F和R^G均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、叠氮基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁶取代;

[0295] 或者R^C和R^D与它们所附接至的氮原子一起形成任选地被一个或多个R⁶取代的环(例如,5-7元环);

[0296] 每个R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、叠氮基、氧代基、-OR^{A1}、-C(O)OR^{A1}、-C(O)R^{B1}、-OC(O)R^{B1}、-N(R^{C1})(R^{D1})、-N(R^{C1})C(O)R^{B1}、-C(O)N(R^{C1})、SR^{E1}、S(O)_xR^{E1}、-OS(O)_xR^{E1}、-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}、-S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})、-P(R^{F1})_y、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

[0297] 每个R^{A1}、R^{B1}、R^{C1}、R^{D1}、R^{E1}和R^{F1}均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基均任选地被一个或多个R⁷取代;

[0298] 每个R⁷均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、氧代基、羟基、环烷基或杂环基;

[0299] x是1或2;并且

[0300] y是2、3或4。

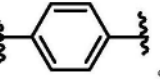
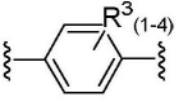
[0301] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),A是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-、-N(R^C)C(O)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烯基)-或-N(R^C)-。在一些实施方案中,A是烷基、烯基、炔

基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-或-N(R^C)-。在一些实施方案中,A是烷基、烯基、炔基、杂烷基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)-或-N(R^C)-。在一些实施方案中,A是烷基、-O-、-C(O)O-、-C(O)-、-OC(O)或-N(R^C)-。在一些实施方案中,A是-N(R^C)C(O)-、-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-或-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烯基)-。在一些实施方案中,A是-N(R^C)-。在一些实施方案中,A是-N(R^C)-,并且R^C和R^D独立地为氢或烷基。在一些实施方案中,A是-NH-。在一些实施方案中,A是-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-,其中亚烷基被R¹取代。在一些实施方案中,A是-N(R^C)C(O)(C₁-C₆-亚烷基)-,并且R¹是烷基(例如,甲基)。在一些实施方案中,A是-NH C(O)C(CH₃)₂-。在一些实施方案中,A是-N(R^C)C(O)(亚甲基)-,并且R¹是烷基(例如,甲基)。在一些实施方案中,A是-NHC(O)CH(CH₃)-。在一些实施方案中,A是-NHC(O)C(CH₃)-。

[0302] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),L¹是键、烷基或杂烷基。在一些实施方案中,L¹是键或烷基。在一些实施方案中,L¹是键。在一些实施方案中,L¹是烷基。在一些实施方案中,L¹是C₁-C₆烷基。在一些实施方案中,L¹是-CH₂-、-CH(CH₃)-、-CH₂CH₂CH₂或-CH₂CH₂-。在一些实施方案中,L¹是-CH₂-或-CH₂CH₂-。

[0303] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),L³是键、烷基或杂烷基。在一些实施方案中,L³是键。在一些实施方案中,L³是烷基。在一些实施方案中,L³是C₁-C₁₂烷基。在一些实施方案中,L³是C₁-C₆烷基。在一些实施方案中,L³是-CH₂-。在一些实施方案中,L³是杂烷基。在一些实施方案中,L³是任选地被一个或多个R²(例如,氧代基)取代的C₁-C₁₂杂烷基。在一些实施方案中,L³是任选地被一个或多个R²(例如,氧代基)取代的C₁-C₆杂烷基。在一些实施方案中,L³是-C(O)OCH₂-、-CH₂(OCH₂CH₂)₂-、-CH₂(OCH₂CH₂)₃-、CH₂CH₂O-或-CH₂O-。在一些实施例中,L³是-CH₂O-。

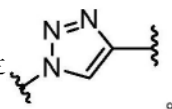
[0304] 在一些实施方案中,对于式(III)或(III-a),M是不存在、烷基、杂烷基、芳基或杂芳基。在一些实施方案中,对于式(III)或(III-a),M是不存在、烷基、杂烷基、芳基或杂芳基。在一些实施方案中,M是杂烷基、芳基或杂芳基。在一些实施方案中,M不存在。在一些实施方案中,M是烷基(例如,C₁-C₆烷基)。在一些实施方案中,M是-CH₂-。在一些实施方案中,M是杂烷基(例如,C₁-C₆杂烷基)。在一些实施方案中,M是(-OCH₂CH₂)_z,其中z是选自1至10的整数。在一些实施方案中,z是选自1至5的整数。在一些实施方案中,M是-(OCH₂)₂-、(-OCH₂CH₂)₂-、(-OCH₂CH₂)₃-、(-OCH₂CH₂)₄或(-OCH₂CH₂)₅。在一些实施方案中,M是-OCH₂CH₂-、(-OCH₂CH₂)₂-、(-OCH₂CH₂)₃或(-OCH₂CH₂)₄。在一些实施方案中,M是-(-OCH₂)₃。在一些实施方案中,M是芳基。在一些实施方案中,M是苯基。在一些实施方案中,M是未取代的苯基。在一些

实施方案中,M是 在一些实施方案中,M是 在一些实施方案中,M

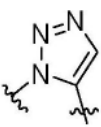
是被1-4个R³(例如,1个R³)取代的苯基。在一些实施方案中,R³是CF₃。

[0305] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),P是不存在、杂环基或杂芳基。在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),P是不存在、杂环基或杂芳基。在一些实施方案中,P是不存在。在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),P是三环、双环或单环杂芳基。在一些实施方案中,P是单环杂芳基。在一些实施方案中,P是含氮杂芳基。在一些实施方案中,P是单环含氮杂芳基。在一些实施方案中,P是5元杂芳基。在一些实施方案中,P是5元含氮杂芳

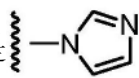
基。在一些实施方案中,P是四唑基、咪唑基、吡唑基,或三唑基或吡咯基。在一些实施方案中,P是咪唑基。在一些实施方案中,P是1,2,3-三唑基。在一些实施方案中,P是



在一些实施方案中,P是

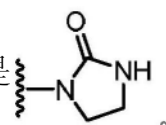


在一些实施方案中,P是

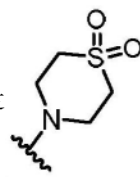


[0306] 在一些实施方案中,P是杂环基。在一些实施方案中,P是杂环基。在一些实施方案

中,P是5元杂环基。在一些实施方案中,P是咪唑烷酮基。在一些实施方案中,P是

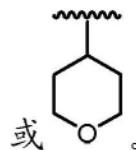
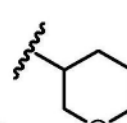
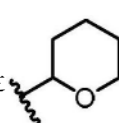


在一些实施方案中,P是硫代吗啉基-1,1-二氧化基。在一些实施方案中,P是



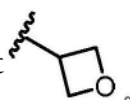
[0307] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),Z是烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),Z是烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。在一些实施方案中,Z是杂环基。在一些实施方案中,Z是单环或双环杂环基、5元杂环基或6元杂环基。在一些实施方案中,Z是6元含氧杂环基。在一些实施方案中,Z

是四氢吡喃基。在一些实施方案中,Z是

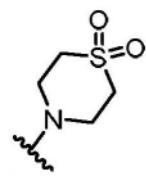


在一些实施方案中,

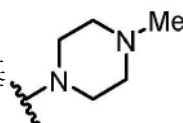
Z是4元含氧杂环基。在一些实施方案中,Z是



[0308] 在一些实施方案中,Z是双环含氧杂环基。在一些实施方案中,Z是双环含氧杂环基。在一些实施方案中,Z是邻苯二甲酸酐基。在一些实施方案中,Z是含硫杂环基



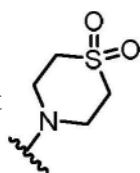
在一些实施方案中,Z是6元含硫杂环基



在一些实施方案中,Z是含

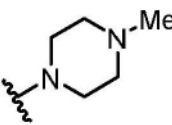
有氮原子和硫原子的6元杂环基。在一些实施方案中,Z是硫代吗啉基-1,1-二氧化基。在一

些实施方案中,Z是



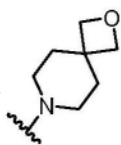
在一些实施方案中,Z是含氮杂环基。在一些实施方案中,Z是

6元含氮杂环基。在一些实施方案中,Z是



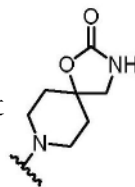
[0309] 在一些实施方案中,Z是双环杂环基。在一些实施方案中,Z是双环杂环基。在一些实施方案中,Z是任选地被一个或多个 R^5 取代的双环含氮杂环基。在一些实施方案中,Z是2-

氧杂-7-氮杂螺[3.5]壬基。在一些实施方案中,Z是



在一些实施方案中,Z是1-氧

杂-3,8-二氮杂螺[4.5]癸-2-酮。在一些实施方案中,Z是



[0310] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),Z是芳基。在一些实施方案中,Z是单环芳基。在一些实施方案中,Z是苯基。在一些实施方案中,Z是(例如,被1个 R^5)单取代的苯基。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 是含氮基团。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 是 NH_2 。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 是含氧基团。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 是含氧杂烷基。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 是 OCH_3 。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 位于邻位。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 位于间位。在一些实施方案中,Z是单取代的苯基,其中1个 R^5 位于对位。

[0311] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),Z是烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_{12} 烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_{10} 烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_8 烷基。在一些实施方案中,Z是被1-5个 R^5 取代的 C_1 - C_8 烷基。在一些实施方案中,Z是被1个 R^5 取代的 C_1 - C_8 烷基。在一些实施方案中,Z是被1个 R^5 取代的 C_1 - C_8 烷基,其中 R^5 是烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 、 $-C(O)R^{B1}$ 、 $-OC(O)R^{B1}$ 或 $-N(R^{C1})(R^{D1})$ 。在一些实施方案中,Z是被1个 R^5 取代的 C_1 - C_8 烷基,其中 R^5 是 $-OR^{A1}$ 或 $-C(O)OR^{A1}$ 。在一些实施方案中,Z是被1个 R^5 取代的 C_1 - C_8 烷基,其中 R^5 是 $-OR^{A1}$ 或 $-C(O)OH$ 。在一些实施方案中,Z是 $-CH_3$ 。

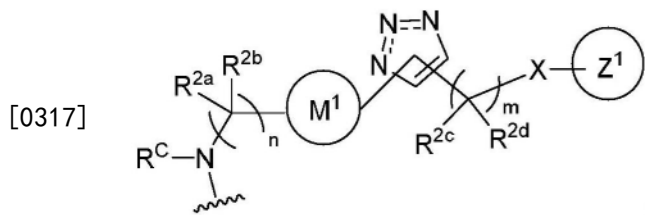
[0312] 在一些实施方案中,对于式(III)和(III-a),Z是杂烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_{12} 杂烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_{10} 杂烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_8 杂烷基。在一些实施方案中,Z是 C_1 - C_6 杂烷基。在一些实施方案中,Z是任选地被一个或多个 R^5 取代的含氮杂烷基。在一些实施方案中,Z是被1-5个 R^5 取代的含氮和硫的杂烷基。在一些实施方案中,Z是N-甲基-2-(甲基磺酰基)乙-1-氨基自由基(aminyl)。

[0313] 在一些实施方案中,Z是 $-OR^A$ 或 $-C(O)OR^A$ 。在一些实施方案中,Z是 $-OR^A$ (例如, $-OH$ 或 $-OCH_3$)。在一些实施方案中,Z是 $-OCH_3$ 。在一些实施方案中,Z是 $-C(O)OR^A$ (例如, $-C(O)OH$)。

[0314] 在一些实施方案中,Z是氢。

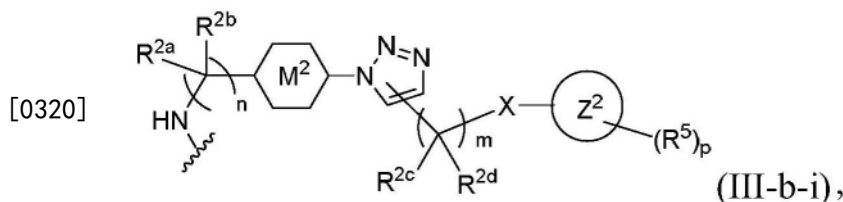
[0315] 在一些实施方案中, L^2 是键并且P和 L^3 独立地不存在。在一些实施方案中, L^2 是键,P是杂芳基, L^3 是键,并且Z是氢。在一些实施方案中,P是杂芳基, L^3 是杂烷基,并且Z是烷基。

[0316] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(III-b)化合物:



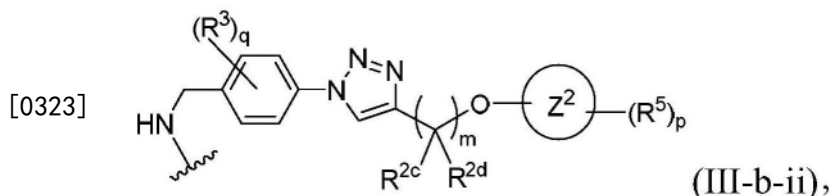
[0318] 或其药学上可接受的盐,其中环 M^1 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被1-5个 R^3 取代;环 Z^1 是任选地被1-5个 R^5 取代的环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤基、氰基、硝基、氨基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者一起形成氧代基; X 是不存在、 $N(R^{10})$ (R^{11})、 O 或 S ; R^C 是氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代;每个 R^3 、 R^5 和 R^6 均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、叠氮基、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 、 $-C(O)R^{B1}$ 、 $-OC(O)R^{B1}$ 、 $-N(R^{C1})$ (R^{D1})、 $-N(R^{C1})C(O)R^{B1}$ 、 $-C(O)N(R^{C1})$ 、 SR^{E1} 、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; R^{10} 和 R^{11} 中的每一者均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、 $-C(O)OR^{A1}$ 、 $-C(O)R^{B1}$ 、 $-OC(O)R^{B1}$ 、 $-C(O)N(R^{C1})$ 、环烷基、杂环基或杂芳基;每个 R^{A1} 、 R^{B1} 、 R^{C1} 、 R^{D1} 和 R^{E1} 均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基,其中烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基中的每一者均任选地被1-6个 R^7 取代;每个 R^7 均独立地为烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤素、氰基、氧代基、羟基、环烷基或杂环基;每个 m 和 n 均独立地为1、2、3、4、5或6;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。在一些实施方案中,对于每个 R^3 和 R^5 ,每个烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选地且独立地被卤素、氧代基、氰基、环烷基或杂环基取代。

[0319] 在一些实施方案中,式(III-b)化合物为式(III-b-i)化合物:



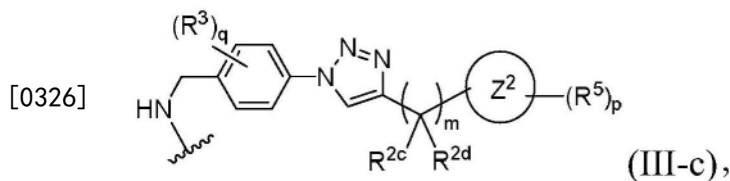
[0321] 或其药学上可接受的盐,其中环 M^2 是任选地被一个或多个 R^3 取代的芳基或杂芳基;环 Z^2 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基,或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者一起形成氧代基; X 是不存在、 O 或 S ;每个 R^3 和 R^5 均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$,其中每个烷基和杂烷基均任选地被卤素取代;或者两个 R^5 一起形成与环 Z^2 耦合的5-6元环;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; p 是0、1、2、3、4、5或6;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0322] 在一些实施方案中,式(III-b-i)化合物为式(III-b-ii)化合物:



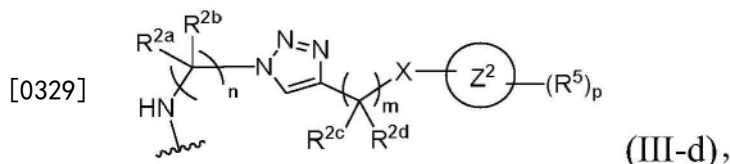
[0324] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^2 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基,或者 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基;每个 R^3 和 R^5 均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$,其中每个烷基和杂烷基均任选地被卤素取代;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; p 和 q 中的每一者均独立地为0、1、2、3、4、5或6;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0325] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(III-c)化合物:



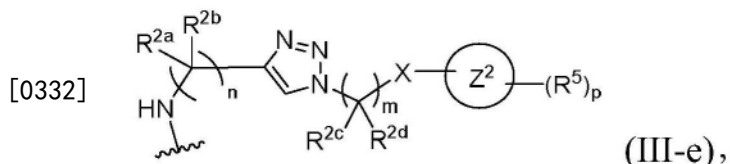
[0327] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^2 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基,或者 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基;每个 R^3 和 R^5 均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR$ 、 $-C(O)OR$ 或 $-C(O)R^{B1}$,其中每个烷基和杂烷基均任选地被卤素取代;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 是1、2、3、4、5或6; p 和 q 中的每一者均独立地为0、1、2、3、4、5或6;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0328] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(III-d)化合物:



[0330] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^2 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; X 是不存在、 O 或 S ; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基,或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者一起形成氧代基;每个 R^5 均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$,其中每个烷基和杂烷基均任选地被卤素取代;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 中的每一者均独立地为1、2、3、4、5或6; p 是0、1、2、3、4、5或6;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

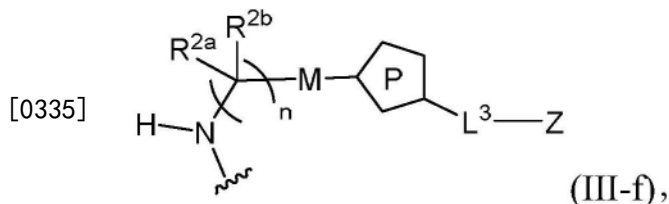
[0331] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(III-e)化合物:



[0333] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^2 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基; X 是不存在、 O 或 S ; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基,或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者一起形成氧代基;每个 R^5 均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或

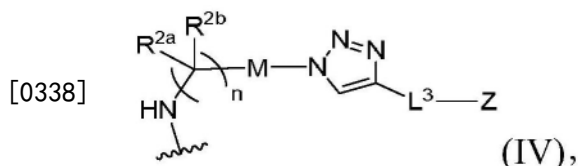
$C(O)R^{B1}$; 每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 中的每一者均独立地为1、2、3、4、5或6; p 是0、1、2、3、4、5或6; 并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0334] 在一些实施方案中, 式 (III) 化合物为式 (III-f) 化合物:



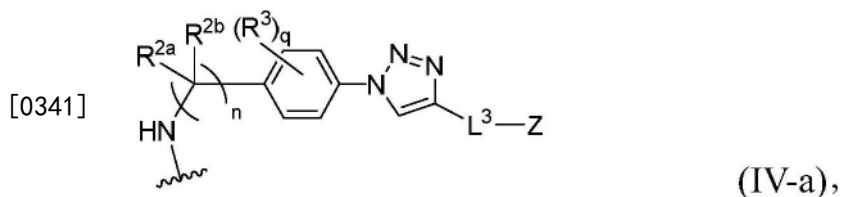
[0336] 或其药学上可接受的盐, 其中 M 是任选地被一个或多个 R^3 取代的烷基; 环 P 是任选地被一个或多个 R^4 取代的杂芳基; L^3 是任选地被一个或多个 R^2 取代的烷基或杂烷基; Z 是烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基, 其中的每一者均任选地被一个或多个 R^5 取代; R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基, 或者 R^{2a} 和 R^{2b} 一起形成氧代基; 每个 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$; 每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; n 独立地为1、2、3、4、5或6; 并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0337] 在一些实施方案中, 式 (III) 化合物为式 (IV) 化合物:



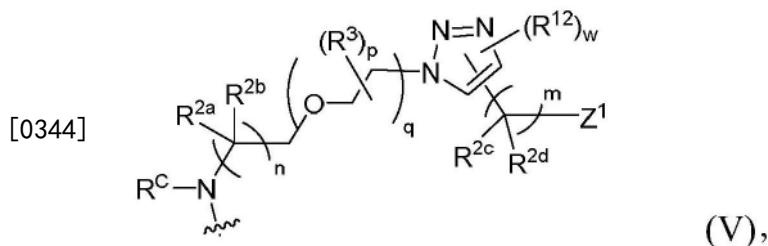
[0339] 或其药学上可接受的盐, 其中 M 是键、烷基或芳基, 其中烷基和芳基任选地被一个或多个 R^3 取代; L^3 是任选地被一个或多个 R^2 取代的烷基或杂烷基; Z 是氢、烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基或 $-OR$, 其中烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选地被一个或多个 R^5 取代; R^A 是氢; R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基, 或者 R^{2a} 和 R^{2b} 一起形成氧代基; 每个 R^2 、 R^3 和 R^5 独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$; 每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; n 独立地为1、2、3、4、5或6; 并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0340] 在一些实施方案中, 式 (IV) 化合物为式 (IV-a) 化合物:



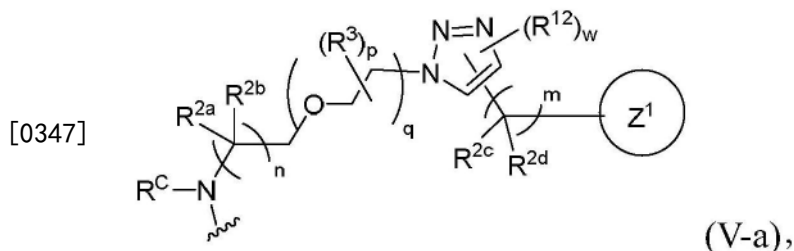
[0342] 或其药学上可接受的盐, 其中 L^3 是烷基或杂烷基, 其中的每一者均任选地被一个或多个 R^2 取代; Z 是氢、烷基、杂烷基或 $-OR^A$, 杂烷基任选地被一个或多个 R^5 取代; R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢、烷基或杂烷基, 或者 R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者一起形成氧代基; 每个 R^2 、 R^3 和 R^5 独立地为杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$; R^A 是氢; 每个 R^{A1} 和 R^{B1} 独立地为氢、烷基或杂烷基; n 独立地为1、2、3、4、5或6; 并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0343] 在一些实施方案中,式(III)化合物为式(V)化合物:



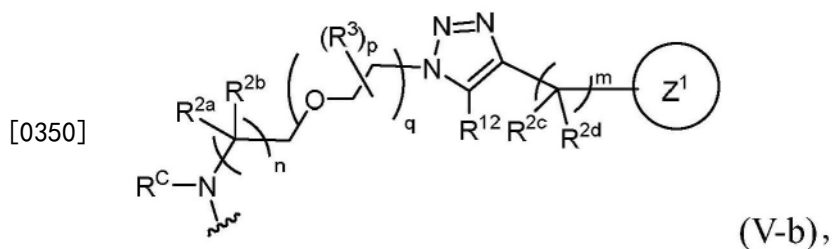
[0345] 或其药学上可接受的盐,其中 Z^1 是烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被1-5个 R^5 取代; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、卤基、氰基、硝基、氨基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者一起形成氧代基; R^C 是氢、烷基、烯基、炔基或杂烷基,其中烷基、烯基、炔基或杂烷基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代; R^3 、 R^5 和 R^6 中的每一者均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$;每个 R^{12} 均独立地为氘、烷基、杂烷基、卤代烷基、卤素、氰基、硝基或氨基;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; q 是0至25的整数; w 是0或1;并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0346] 在一些实施方案中,式(V)化合物为式(V-a)化合物:



[0348] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^1 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被1-5个 R^5 取代; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢、烷基、杂烷基、卤基;或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基; R^C 是氢、烷基、烯基、炔基或杂烷基,其中烷基、烯基、炔基或杂烷基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代; R^3 、 R^5 和 R^6 中的每一者均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$;每个 R^{12} 均独立地为氘、烷基、杂烷基、卤代烷基、卤素、氰基、硝基或氨基;每个 R^{A1} 和 R^{B1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; o 和 p 各自独立地为0、1、2、3、4或5; q 是0至25的整数; w 是0或1;并且“”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

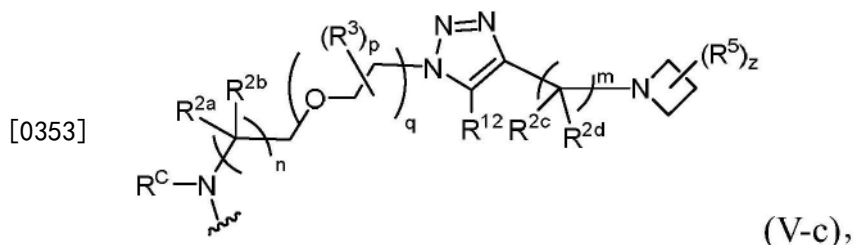
[0349] 在一些实施方案中,式(V)化合物为式(V-b)化合物:



[0351] 或其药学上可接受的盐,其中环 Z^1 是环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其中的每一者均任选地被1-5个 R^5 取代; R^C 是氢、烷基、 $-N(R^C)C(O)R^B$ 、 $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-烷基})$ 或 $-N(R^C)C$

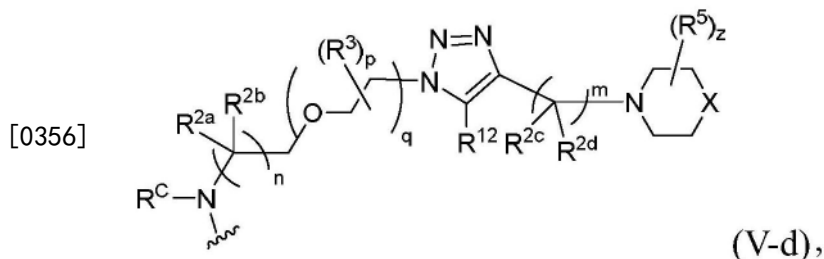
(O) (C_1-C_6 -烯基), 其中烷基和烯基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢或烷基;或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基; R^3 、 R^5 和 R^6 中的每一者均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$; R^{12} 是氢、氘、烷基、杂烷基、卤代烷基、卤素、氰基、硝基或氨基;每个 R^{A1} 、 R^{B1} 和 R^{E1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; q 是0至25的整数; x 是0、1或2;并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0352] 在一些实施方案中,式(V)化合物为式(V-c)化合物:



[0354] 或其药学上可接受的盐,其中 R^C 是氢、烷基、 $-N(R^C)C(O)R^B$ 、 $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6$ -烷基)或 $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6$ -烯基), 其中烷基和烯基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢或烷基;或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基; R^3 、 R^5 和 R^6 中的每一者均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$; R^{12} 是氢、氘、烷基、杂烷基、卤代烷基、卤基、氰基、硝基或氨基;每个 R^{A1} 、 R^{B1} 和 R^{E1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; q 是0至25的整数; x 是0、1或2; z 是0、1、2、3、4、5或6,并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0355] 在一些实施方案中,式(V)化合物为式(V-d)化合物:



[0357] 或其药学上可接受的盐,其中 X 是 $C(R')(R'')$ 、 $N(R')$ 或 $S(O)_x$; R' 和 R'' 中的每一者均独立地为氢、烷基或卤素; R^C 是氢、烷基、 $-N(R^C)C(O)R^B$ 、 $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6$ -烷基)或 $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6$ -烯基), 其中烷基和烯基中的每一者均任选地被1-6个 R^6 取代; R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢或烷基;或者 R^{2a} 和 R^{2b} 或 R^{2c} 和 R^{2d} 一起形成氧代基; R^3 、 R^5 和 R^6 中的每一者均独立地为烷基、杂烷基、卤素、氧代基、 $-OR^{A1}$ 、 $-C(O)OR^{A1}$ 或 $-C(O)R^{B1}$; R^{12} 是氢、氘、烷基、杂烷基、卤代烷基、卤基、氰基、硝基或氨基;每个 R^{A1} 、 R^{B1} 和 R^{E1} 均独立地为氢、烷基或杂烷基; m 和 n 各自独立地为1、2、3、4、5或6; q 是0至25的整数; x 是0、1或2; z 是0、1、2、3、4、5或6,并且“ $\sim$ ”是指与本文所述的附接基团或聚合物的连接。

[0358] 在一些实施方案中, X 是 $S(O)_x$ 。在一些实施方案中, x 是2。在一些实施方案中, X 是 $S(O)_2$ 。

[0359] 在一些实施方案中, R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢。

[0360] 在一些实施方案中, R^C 是氢、 $-C(O)(C_1-C_6$ -烷基)或 $-C(O)(C_1-C_6$ -烯基)。在一些实施

方案中,烷基和烯基中的每一者被1个 R^6 (例如, $-\text{CH}_3$)取代。在一些实施方案中, R^C 是氢。

[0361] 在一些实施方案中, n 是1。在一些实施方案中, q 是2、3、4或5。在一些实施方案中, q 是3。在一些实施方案中, m 是1。在一些实施方案中, p 是0。在一些实施方案中, R^{12} 是卤基(例如, Cl)。

[0362] 在一些实施方案中,化合物为式(III)化合物。在一些实施方案中, L^2 是键并且 P 和 L^3 独立地不存在。

[0363] 在一些实施方案中,化合物为式(III-a)化合物。在式(IV-a)的一些实施方案中, L^2 是键, P 是杂芳基, L^3 是键,并且 Z 是氢。在一些实施方案中, P 是杂芳基, L^3 是杂烷基,并且 Z 是烷基。在一些实施方案中, L^2 是键并且 P 和 L^3 独立地不存在。在一些实施方案中, L^2 是键, P 是杂芳基, L^3 是键,并且 Z 是氢。在一些实施方案中, P 是杂芳基, L^3 是杂烷基,并且 Z 是烷基。

[0364] 在一些实施方案中,化合物为式(III-b)化合物。在一些实施方案中, P 是不存在, L^1 是 $-\text{NHCH}_2$, L^2 是键, M 是芳基(例如,苯基), L^3 是 $-\text{CH}_2\text{O}$,并且 Z 是杂环基(例如,含氮杂环基,例如硫代吗啉基-1,1-二氧化物)。在一些实施方案中,式(I-b)化合物为化合物116。

[0365] 在式(III-b)的一些实施方案中, P 是不存在, L^1 是 $-\text{NHCH}_2$, L^2 是键, M 是不存在, L^3 是键,并且 Z 是杂环基(例如,含氧杂环基,例如四氢吡喃基、四氢呋喃基、氧杂环丁烷基或环氧乙烷基)。在一些实施方案中,式(III-b)化合物为化合物105。

[0366] 在一些实施方案中,该化合物为式(III-b-i)化合物。在式(III-b-i)的一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢或 CH_3 , R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢, m 是1或2, n 是1, X 是0, p 是0, M^2 是任选地被一个或多个 R^3 取代的苯基, R^3 是 $-\text{CF}_3$,并且 Z^2 是杂环基(例如,含氧杂环基,例如四氢吡喃基、四氢呋喃基、氧杂环丁烷基或环氧乙烷基)。在一些实施方案中,式(III-b-i)化合物为化合物100、化合物106、化合物107、化合物108、化合物109或化合物111。

[0367] 在一些实施方案中,该化合物为式(III-b-ii)化合物。在式(III-b-ii)的一些实施方案中, R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢, q 是0, p 是0, m 是1,并且 Z^2 是杂环基(例如,含氧杂环基,例如四氢吡喃基)。在一些实施方案中,式(III-b-ii)化合物为化合物100。

[0368] 在一些实施方案中,化合物为式(III-c)化合物。在式(III-c)的一些实施方案中, R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢, m 是1, p 是1, q 是0, R^5 是 $-\text{CH}_3$,并且 Z 是杂环基(例如,含氮杂环基,例如哌嗪基)。在一些实施方案中,式(I-c)化合物为化合物113。

[0369] 在一些实施方案中,该化合物为式(III-d)化合物。在式(III-d)的一些实施方案中, R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者均独立地为氢, m 是1, n 是3, X 是0, p 是0,并且 Z 是杂环基(例如,含氧杂环基,例如四氢吡喃基、四氢呋喃基、氧杂环丁烷基或环氧乙烷基)。在一些实施方案中,式(III-d)化合物为化合物110或化合物114。

[0370] 在一些实施方案中,该化合物为式(III-f)化合物。在式(III-f)的一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢, n 是1, M 是 $-\text{CH}_2-$, P 是含氮杂芳基(例如,咪唑基), L^3 是 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2-$,并且 Z 是 CH_3 。在一些实施方案中,式(III-f)化合物为化合物115。

[0371] 在一些实施方案中,该化合物为式(IV-a)化合物。在式(IV-a)的一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢, n 是1, q 是0, L^3 是 $-\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$,并且 Z 是 $-\text{OCH}_3$ 。在一些实施方案中,式(IV-a)化合物为化合物112。

[0372] 在式(IV-a)的一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 中的每一者均独立地为氢, n 是1, L^3 是键

或-CH₂,并且Z是氢或-OH。在一些实施方案中,式(IV-a)化合物为化合物103或化合物104。

[0373] 在一些实施方案中,该化合物为式(V)化合物。在式(V)的一些实施方案中,R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的每一者均独立地为氢,m是1,n是2,q是3,p是0,R^C是氢,并且Z¹是任选地被R⁵取代的杂烷基(例如,-N(CH₃)(CH₂CH₂)S(O)₂CH₃)。在一些实施方案中,式(V)化合物为化合物120。

[0374] 在一些实施方案中,该化合物为式(V-b)化合物。在式(V-b)的一些实施方案中,R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的每一者均独立地为氢,m是0,n是2,q是3,p是0,并且Z²是被1个R⁵(例如-NH₂)取代的芳基(例如苯基)。在一些实施方案中,式(III-b)化合物为化合物102。

[0375] 在一些实施方案中,该化合物为式(V-b)化合物。在式(V-b)的一些实施方案中,R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的每一者均独立地为氢,m是1,n是2,q是3,p是0,R^C是氢,并且Z²是杂环基(例如,含氮杂环基,例如含氮螺杂环基,例如2-氧杂-7-氮杂螺[3.5]壬基)。在一些实施方案中,式(V-b)化合物为化合物121。

[0376] 在一些实施方案中,该化合物为式(V-d)化合物。在式(V-d)的一些实施方案中,R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的每一者均独立地为氢,m是1,n是2,q是1、2、3或4,p是0,并且X是S(O)₂。在式(V-d)的一些实施方案中,R^{2a}和R^{2b}中的每一者均独立地为氢,m是1,n是2,q是1、2、3或4,p是0,并且X是S(O)₂。在一些实施方案中,式(V-d)化合物为化合物101、化合物117、化合物118或化合物119。

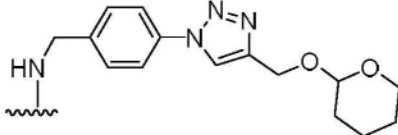
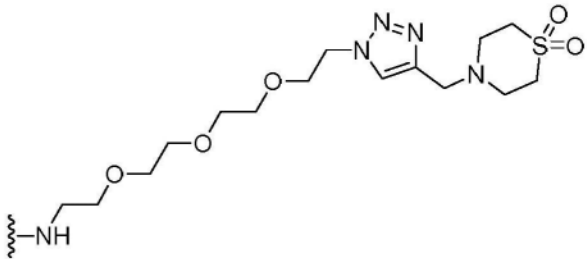
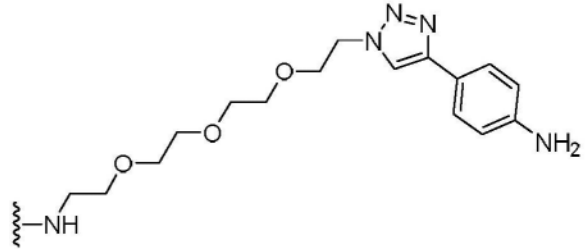
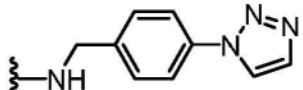
[0377] 在一些实施方案中,该化合物为式(III-b)、(III-d)或(III-e)化合物。在一些实施方案中,该化合物为式(III-b)、(III-d)或(IV)化合物。在一些实施方案中,该化合物为式(III-b)、(III-d)或(III-f)化合物。在一些实施方案中,该化合物为式(III-b)、(III-d)或(V)化合物。

[0378] 在一些实施方案中,式(I)化合物不是W02012/112982、W02012/167223、W02014/153126、W02016/019391、WO 2017/075630、US 2012-0213708、US 2016-0030359或US 2016-0030360中公开的化合物。

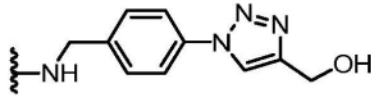
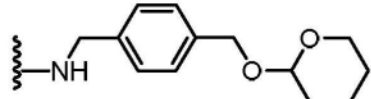
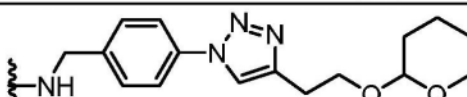
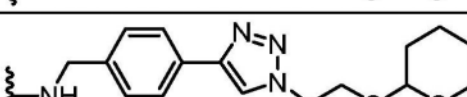
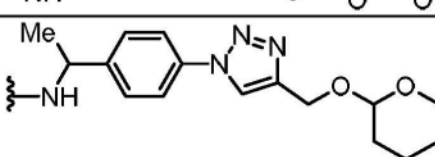
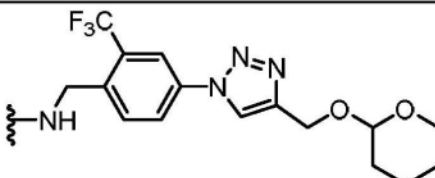
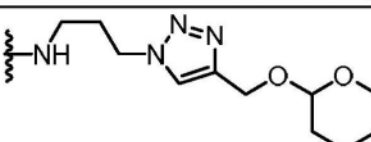
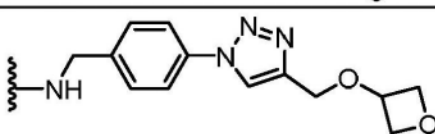
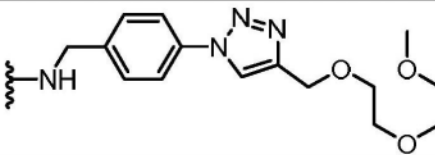
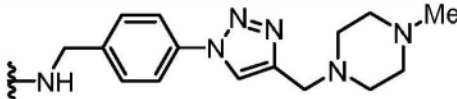
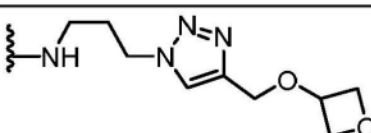
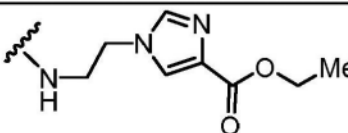
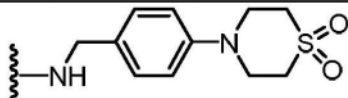
[0379] 在一些实施方案中,式(III)化合物包含本文下文表6中所示的化合物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本文所述的设备内的外表面和/或一个或多个隔室包含表6中所示的小分子化合物,或其药学上可接受的盐。

[0380] 表6:示例性去纤维化的(减轻FBR的)化合物

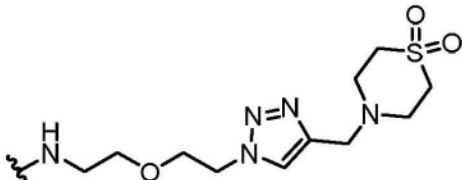
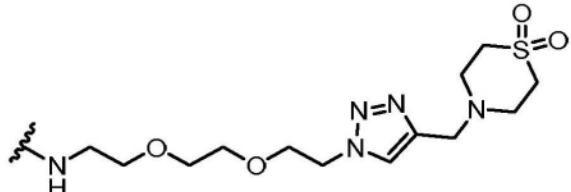
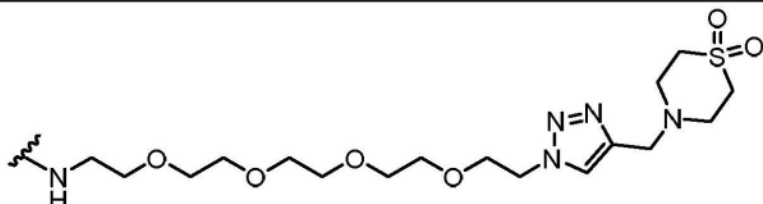
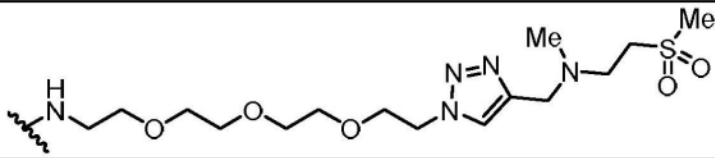
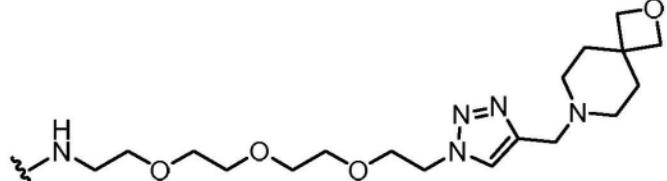
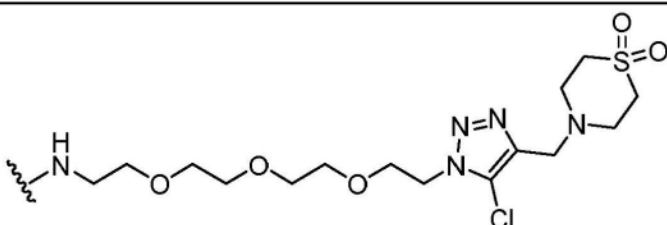
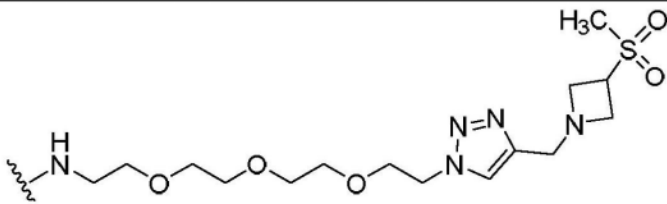
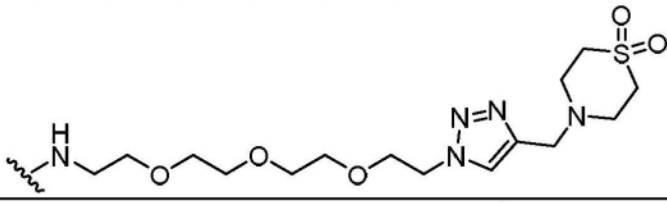
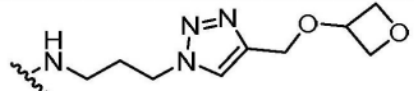
[0381]

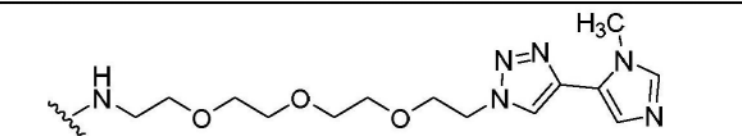
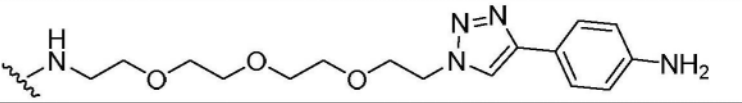
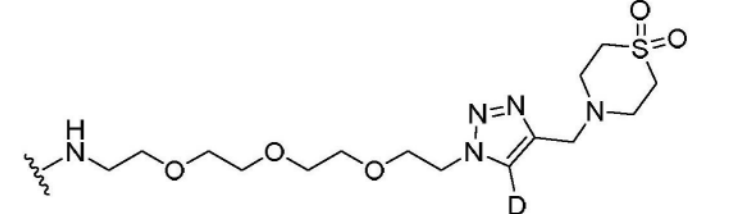
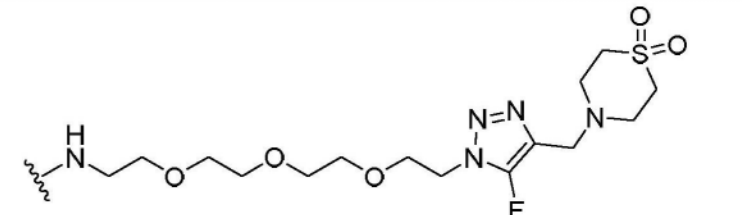
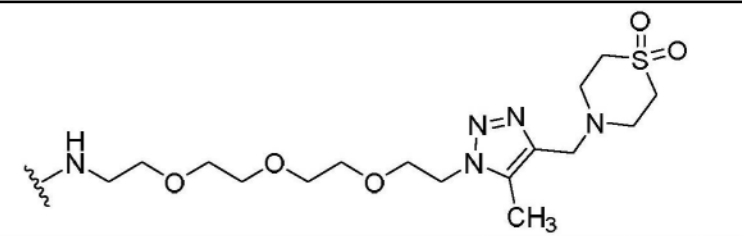
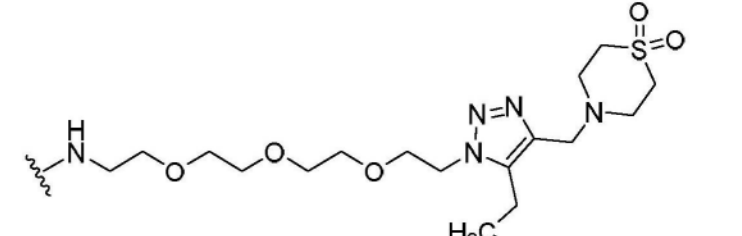
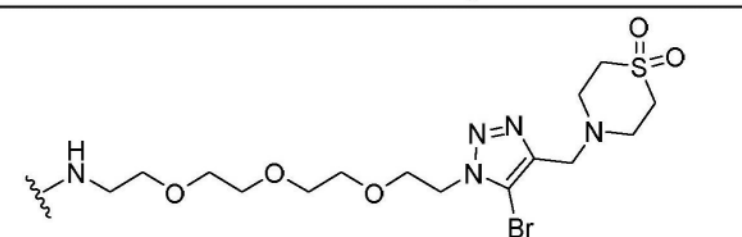
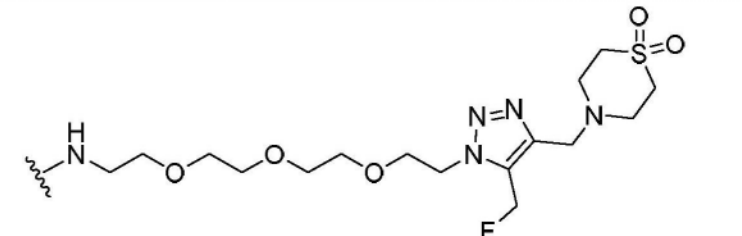
化合物编号	结构
100	
101	
102	
103	

[0382]

104	
105	
106	
107	
108	
109	
110	
111	
112	
113	
114	
115	
116	

[0383]

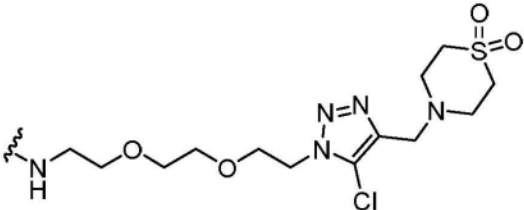
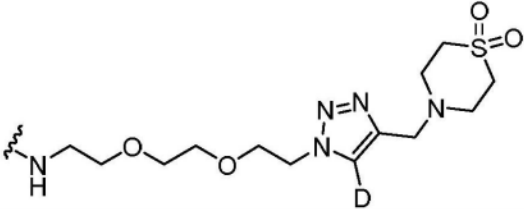
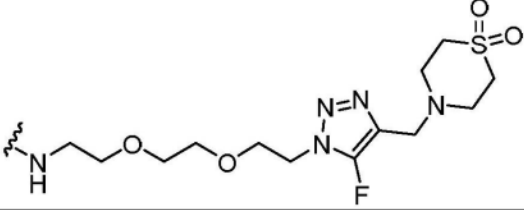
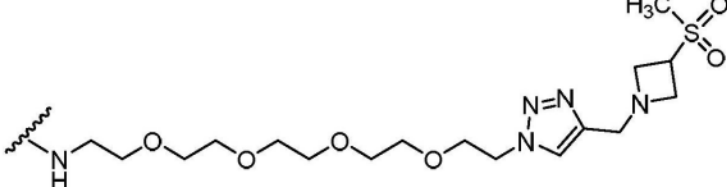
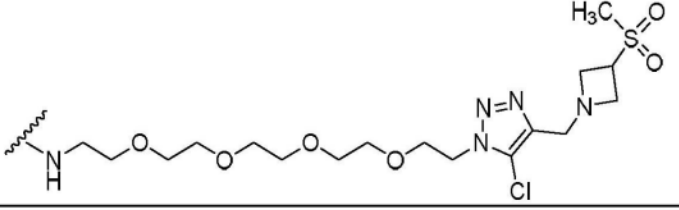
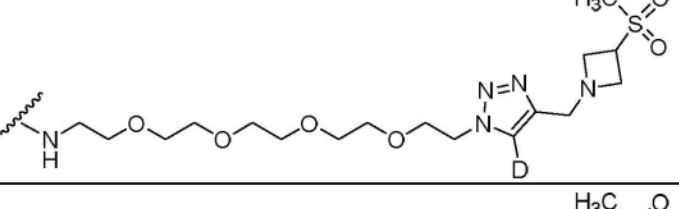
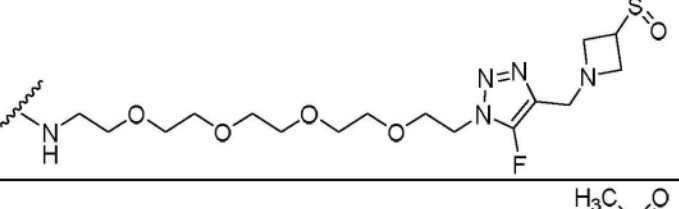
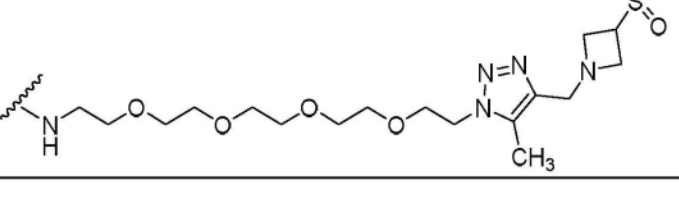
117	
118	
119	
120	
121	
122	
123	
124	
125	

126	
127	
128	
129	
130	
131	
132	
133	

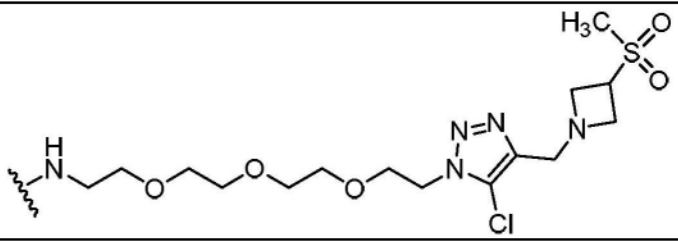
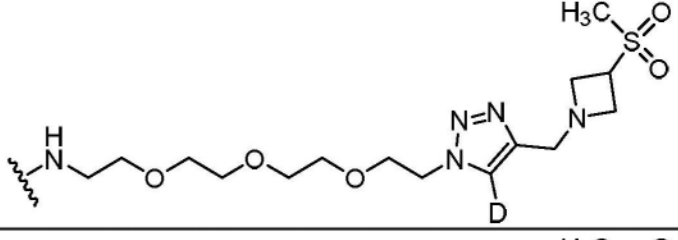
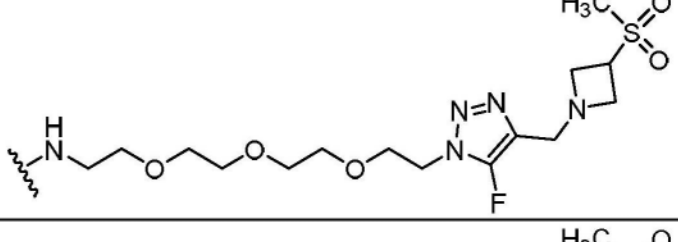
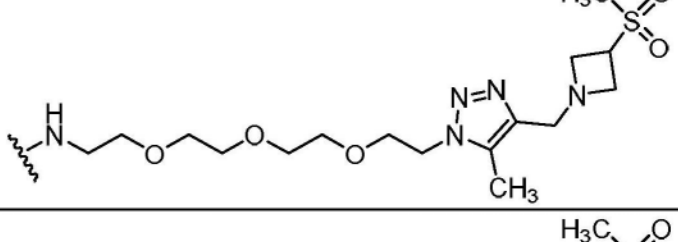
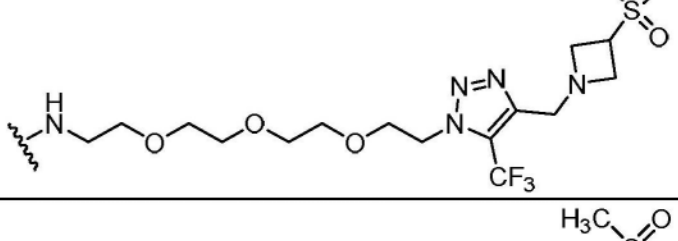
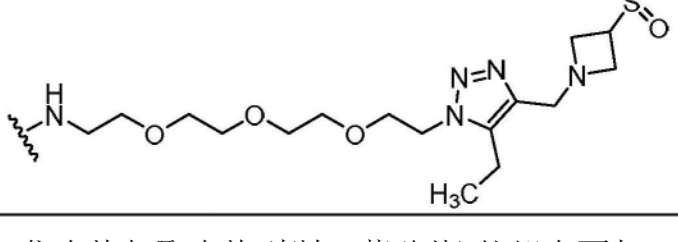
[0384]

134	
135	
136	
[0385] 137	
138	
139	
140	

[0386]

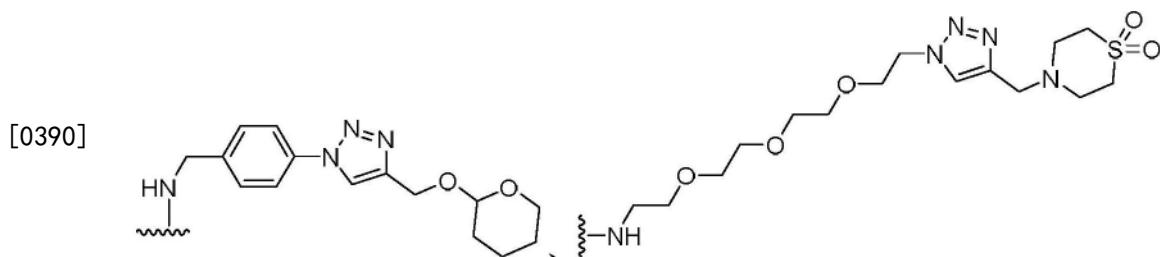
141	
142	
143	
144	
145	
146	
147	
148	

[0387]

149	
150	
151	
152	
153	
154	

[0388] 表6中的化合物中的任何化合物与聚合物(例如,藻酸盐)的缀合可如W0 2019/195055的实施例2中所述或以任何其它合适的化学反应进行。

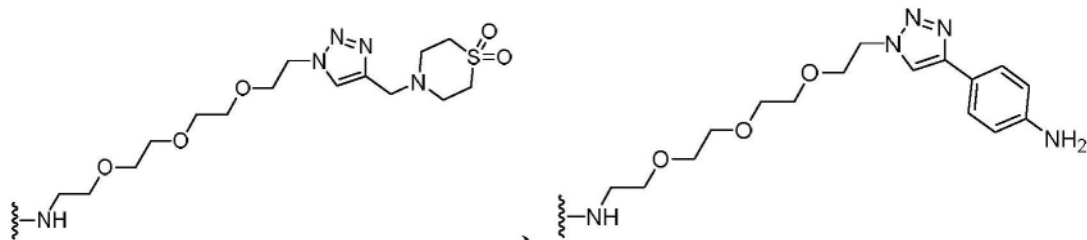
[0389] 在一些实施方案中,该化合物为式(III)化合物或其药学上可接受的盐并且选自:



[0391]  或其药学上可接受的盐。



[0392] 在一些实施方案中,本文所述的设备包含化合物



[0393] 或这两种化合物中的任一种化合物的药学上可接受的盐。

[0394] 在一些实施方案中,如通过如W0 2020/069429中所述的氮百分比的燃烧分析所确定,式(III)化合物(例如,表6中的化合物101)以至少2.0%且小于9.0%,或3.0%至8.0%、4.0-7.0、5.0至7.0或6.0至7.0或约6.8的缀合密度共价附接至藻酸盐(例如,具有近似MW<75kDa、G:M比率 ≥ 1.5 的藻酸盐)。在一个实施方案中,化合物101在经修饰的藻酸盐中的缀合密度通过例如如W02020198695中所述的定量游离胺分析来确定,其中确定的缀合密度是1.0%w/w至3.0%w/w、1.3%w/w至2.8%w/w、1.3%w/w至2.6%w/w、1.5%w/w至2.4%w/w、1.5%w/w至2.2%w/w,或1.7%w/w至2.2%w/w。

[0395] 设备、设备制剂或设备组合物可被构造为用于植入,或者被植入或设置到身体的任何部位或部分之中或之上。在一些实施方案中,可植入设备或设备制剂被构造用于植入到腹膜腔(例如小囊,也称为网膜囊(omental bursa)或法氏囊网膜(bursalis omentum))中。可经由注射或导管将设备、设备制剂或设备组合物植入腹膜腔(例如网膜,例如小囊)中或设置在腹膜腔(例如网膜,例如小囊)内的表面上。用于将设备、设备制剂或设备组合物植入或设置到网膜(例如小囊)中的另外的考虑因素提供于M.Pellicciaro等人(2017)CellR45(3):e2410中。

[0396] 设备制造

[0397] 可使用本领域中已知的方法产生和培养用于制造本文所述的设备的经遗传修饰的ARPE-19细胞。例如,可基本如WO2020198695中所述在体外培养经稳定转染的ARPE-19细胞。

[0398] 可使用本领域中已知的程序(例如基本上如W02020198695中所述的那些)获得式(III)化合物和用此类化合物修饰的藻酸盐。

[0399] 用于制备去纤维化的两隔室水凝胶胶囊的藻酸盐溶液可使用本领域中已知的程序,例如基本上如W02020198695中所述获得。

[0400] 可使用本领域中已知的程序,例如基本上如W02020198696中所述产生两隔室水凝胶胶囊,该两隔室水凝胶胶囊在内部隔室中包封经遗传修饰的哺乳动物细胞并且在外层(“有保护的胶囊(shielded capsule)”)中包封去纤维化藻酸盐。

[0401] 治疗方法

[0402] 本文描述了通过施用或植入本文所述的药物组合物或经遗传修饰的细胞来预防或治疗受试者的CNS疾病或疾患(例如,溶酶体贮积病,例如MPS-1)的方法。在一个实施方案中,药物组合物包含BBB转运融合蛋白质并且被配制用于静脉内或皮下施用。在另一个实施方案中,药物组合物包含多个被遗传修饰成表达BBB转运融合蛋白质的细胞。在一个实施方案中,细胞被包封在本文所述的水凝胶胶囊中。在另一个实施方案中,细胞被包封在本文所述的宏设备中。在一些实施方案中,本文所述的方法直接或间接地减少或缓和CNS疾病或疾患的至少一种症状,或预防或减缓疾病的发作。在一个实施方案中,该方法包括施用(例如,植入)有效量的两隔室藻酸盐水凝胶胶囊的组合物,该胶囊在内部隔室中包含经遗传修饰的RPE细胞和本文所述的细胞结合聚合物,并且在外胶囊表面上且任选地在外隔室内包含式(III)化合物,例如化合物101。

[0403] 治疗MPS-1

[0404] 本公开提供了通过向患有MPS-1的人患者施用本文所述的BBB转运IDUA融合蛋白质来治疗该患者的方法。在一个实施方案中,施用步骤包括植入被工程化成表达并分泌BBB转运IDUA融合蛋白质的细胞,该细胞可被包封在宏设备中或本文所述的两隔室藻酸盐水凝胶胶囊中。在一个实施方案中,表达BBB转运IDUA融合蛋白质的经包封的细胞被植入到腹腔(例如小囊,也称为网膜囊或法氏囊网膜)中。在一个实施方案中,由植入的细胞表达和分泌的BBB转运IDUA融合蛋白质包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29。

[0405] 可使用已用于批准的和实验性的MPS1疗法的一种或多种功效测量来评估使用BBB转运IDUA融合蛋白质治疗的治疗功效。此类功效测量通常包括:尿糖胺聚糖(例如硫酸乙酰肝素)水平降低;肝脏体积减小;用力肺活量稳定;6分钟步行距离增加;呼吸暂停/低通气指数改善;肩关节屈曲增加;儿童健康评估问卷/健康评估问卷残疾指数改善。在一个实施方案中,在植入表达GGG转运IDUA融合蛋白质的细胞之后的所需时间点进行功效测量,并与植入前的基线水平进行比较。在一个实施方案中,所需时间点是15天、30天、60天、120天、一年或更长时间中的任何一个或多个。

[0406] 在一个实施方案中,用本文所述的BBB转运IDUA融合蛋白质治疗受试者导致受试者脑中以及任选地一个或多个非CNS器官和组织(例如肝、脾、肾、心脏和肺)中的硫酸乙酰肝素水平降低。在一个实施方案中,硫酸乙酰肝素水平在所需的时间点被降低了至少10%、25%、50%或更多。

[0407] 列举的示例性实施方案

[0408] 1.一种融合蛋白质,其包含由式I:AB-L1-RB-L2-C或由式II:RB-L1-AB-L2-C定义的N末端至C末端结构,其中在式I和式II中的每一者中:

[0409] AB包含与人血清白蛋白(HSA)结合的结构域;

[0410] L1可存在或不存在,包含第一接头氨基酸序列;

- [0411] RB包含与人IGF1R(hIGF1R)的胞外结构域结合的结构域;
- [0412] L2可存在或不存在,包含与所述第一接头氨基酸序列相同或不同的第二接头氨基酸序列;并且
- [0413] C是货物部分。
- [0414] 2.如实施方案1所述的融合蛋白质,其由式I:AB-L1-RB-L2-C定义。
- [0415] 3.如实施方案1所述的融合蛋白质,其由式II:RB-L1-AB-L2-C定义。
- [0416] 4.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中AB具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量。
- [0417] 5.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中RB具有小于约75kDa、50kDa或25kDa中的任一个的分子量。
- [0418] 6.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物部分具有约1kD至约200kD,或约2kD至约100kD的分子量。
- [0419] 7.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物部分实质上由或由多肽的氨基酸序列组成。
- [0420] 8.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中(i)AB包含对应于抗HSA抗体的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列,或(ii)AB包含表2A中所示的R11 sdAb、R28 sdAb、M75 sdAb或M79sdAb的CDR1、CDR2和CDR3序列。
- [0421] 9.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中AB包含来自单结构域抗体(sdAb)的氨基酸序列,或实质上由或由所述氨基酸序列组成,任选地其中所述氨基酸序列选自自由上表2B中公开的R11、R28、M75和M79氨基酸序列,WO 2006/22787的表II和表III中描述的A1b-1和A1b-8氨基酸序列,以及WO 2012/175400中描述的A1b-23氨基酸序列组成的组。
- [0422] 10.如权利要求7所述的融合蛋白质,其中AB CDR1序列是GRTFIAYA(SEQ ID NO:1)或其保守取代的变体;AB CDR2序列是ITNFAGGTT(SEQ ID NO:2)或其保守取代的变体;并且AB CDR3序列是AADRSAQTMQRVPLPY(SEQ ID NO:3)或其保守取代的变体。
- [0423] 11.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中AB包含来自sdAb的氨基酸序列,实质上由或由来自sdAb的氨基酸序列组成。
- [0424] 12.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中AB实质上由或由上表2B中所示的亲本或人源化序列组成。
- [0425] 13.如实施方案1至12中任一项所述的融合蛋白质,其中AB实质上由或由以下组成:
- [0426] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFTISRDNAKTTVYLMNSLKPEDTALYYCAADRSAQTMQRVPLPYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:4)或其保守取代的变体。
- [0427] 14.如实施方案1至12中任一项所述的融合蛋白质,其中AB实质上由或由以下组成:
- [0428] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFTISRDNAKTTVYLMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMQRVPLPYWGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:5),或其

保守取代的变体。

[0429] 15. 如实施方案1至10中任一项所述的融合蛋白, 其中AB实质上由或由抗体的重链可变区的氨基酸序列组成, 所述抗体与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成的sdAb交叉竞争结合至HSA。

[0430] 16. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由AB结合至HSA的结构域1(DI)或结构域2(DII)并且基本上不抑制人FcRn与HSA的结合。

[0431] 17. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中如通过表面等离子体共振在25℃下所确定, 所述融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由所述AB结构域以小于约0.1nM至约1,000nM的解离常数(K_D)亲和力结合至HSA。

[0432] 18. 如实施方案17所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由AB结构域在约5.5至约7.4的pH范围内以约0.5nM至约500nM、约1nM至约250nM、约5nM至约50nM、约10nM至约25nM, 或约0.5nM至约1nM的 K_D 结合至HSA。

[0433] 19. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质在25℃下在约5.5至约7.4的pH范围内经由AB结合至至少一种哺乳动物血清白蛋白直系同源物。

[0434] 20. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由AB结合至选自由小鼠血清白蛋白、大鼠血清白蛋白、仓鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白、豚鼠白蛋白、猪白蛋白、猫白蛋白、狗白蛋白和非人灵长类动物血清白蛋白组成的组的两种或更多种哺乳动物血清白蛋白, 任选地其中所述非人灵长类动物血清白蛋白是食蟹猴血清白蛋白或恒河猴血清白蛋白。

[0435] 21. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由RB结构域结合至人脑内皮细胞表面上表达的hIGF1R。

[0436] 22. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质基本上不结合至人胰岛素受体(h-IR)。

[0437] 23. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质基本上不抑制胰岛素、胰岛素生长因子1(IGF1)或胰岛素生长因子2(IGF2)与hIGF1R的结合。

[0438] 24. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由RB结合至包含FENFLHNSIFVPR(SEQ ID NO:6)的hIGF1R胞外结构域中的表位。

[0439] 25. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中如通过表面等离子体共振在25℃下所确定, 所述融合蛋白质在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB以约0.1nM至约1,000nM的 K_D 亲和力结合至hIGF1R。

[0440] 26. 如实施方案24所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由RB以(i)约0.2nM至约500nM、250nM、100nM、50nM、25nM或10nM中的任一个; (ii)约0.5nM至约250nM、100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个; 或(iii)约1nM至约100nM、50nM、25nM、10nM或5nM中的任一个的 K_D 结合至hIGF1R。

[0441] 27. 如实施方案25所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由RB以1nM至10nM的 K_D 结合至hIGF1R。

[0442] 28. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质在25℃下并且在约5.0至约7.4的pH范围内经由RB结合至至少一种哺乳动物IGF1R直系同源物。

[0443] 29. 如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质, 其中所述融合蛋白质经由RB结

合至选自由小鼠IGF1R、大鼠IGF1R、仓鼠IGF1R、兔IGF1R、豚鼠IGF1R、狗IGF1R、猫IGF1R和非人灵长类动物IGF1R组成的组的两种或更多种哺乳动物IGF1R蛋白质,任选地其中所述非人灵长类动物IGF1R是食蟹猴IGF1R或恒河猴IGF1R。

[0444] 30.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中(i)RB包含对应于抗hIGF1R抗体的重链可变区的三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列的集合,或(ii)RB包含选自以上表3A中所示的IGF1R-5sdAb、IGF1R-3sdAb和IGF1R-4sdAb的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的第一氨基酸序列、第二氨基酸序列和第三氨基酸序列的集合。

[0445] 31.如实施方案30所述的融合蛋白质,其中RB CDR1序列是GRTIDNYA(SEQ ID NO:7)或其保守取代的变体;RB CDR2序列是IDWGDGGX,其中X是A或T(SEQ ID NO:8),或其保守取代的变体;并且B3 CDR3序列是AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:9)或其保守取代的变体。

[0446] 32.如实施方案31所述的融合蛋白质,其中RB CDR2序列是IDWGDGGA(SEQ ID NO:10)。

[0447] 33.如实施方案30所述的融合蛋白质,其中RB实质上由或由上表3B中所示的亲本或人源化序列组成。

[0448] 34.如实施方案30所述的融合蛋白质,其中RB实质上由或由以下组成:QVKLEESGG GLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSR QAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYL QM NNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVS S(SEQ ID NO:11)或其保守取代的变体。

[0449] 35.如实施方案30所述的融合蛋白质,其中RB实质上由或由以下组成:QVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVR QAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYL QM NSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGLTVTVS S(SEQ ID NO:12)或其保守取代的变体。

[0450] 36.如实施方案1至30中任一项所述的融合蛋白质,其中RB实质上由或由抗体的重链可变区的氨基酸序列组成,所述抗体(i)与由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12组成的sdAb交叉竞争结合至hIGF1R,或(ii)与EP3725806A1中描述的996、1226和1564抗体中的任一者交叉竞争。

[0451] 37.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中存在L1和L2。

[0452] 38.如实施方案37所述的融合蛋白质,其中L1和L2中的每一者均是长度小于50个氨基酸的接头肽,任选地其中L1和L2中的每一者的长度在约15与30个氨基酸之间,或在约20与25个氨基酸之间。

[0453] 39.如实施方案38所述的融合蛋白质,其中L1实质上由或由(GGGGS)_m组成,其中m是4或5。

[0454] 40.如实施方案37至39中任一项所述的融合蛋白质,其中L2实质上由或由(GGGGS)_n组成,其中n是4或5。

[0455] 41.如实施方案39所述的融合蛋白质,其中L1和L2中的每一者均实质上由或由以下组成:GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:14)。

[0456] 42.如以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物部分是选自由以下组成的组的货物多肽:酶、生长因子、细胞因子,或抗体或其抗原结合片段。

[0457] 43.如实施方案42所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽包含由野生型人基因编码的成熟氨基酸序列。

[0458] 44.如实施方案42或43所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是酶。

[0459] 45.如实施方案42至44中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是酸性 α -葡萄糖苷酶蛋白质(GAA)、 α -半乳糖苷酶A(GLA)蛋白质、 α -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)蛋白质、 α -N-乙酰基-氨基葡萄糖苷酶(NAGLU)、 β -葡萄糖醛酸酶(GUSB)蛋白质、 β -葡萄糖苷酶(GBA)蛋白质、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)蛋白质、乙酰肝素- α -氨基葡萄糖苷N-乙酰转移酶(HGSNAT)蛋白质、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶(GNS)蛋白质或N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)蛋白质,任选地其中所述货物多肽不是IDS蛋白质。

[0460] 46.如实施方案45所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是IDUA蛋白质,任选地其中所述货物多肽包含由野生型人IDUA基因编码的成熟氨基酸序列,实质上由或由所述成熟氨基酸序列组成。

[0461] 47.如实施方案42至46中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是IDUA蛋白质并且包含图1H中所示的前体人IDUA氨基酸序列的氨基酸26、27或28至氨基酸653。

[0462] 48.如实施方案42至47中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是IDUA蛋白质并且实质上由图1H中所示的氨基酸序列的氨基酸27-653组成。

[0463] 49.如实施方案46至48中任一项所述的融合蛋白质,其具有在野生型人IDUA蛋白质的相应酶活性的80%-120%以内的IDUA酶活性。

[0464] 50.如实施方案42至45中任一项所述的融合蛋白质,其中所述货物多肽是IDS蛋白质,任选地其中所述货物多肽包含图12A或图12B中所示的氨基酸序列,实质上由或由所述氨基酸序列组成。

[0465] 51.如实施方案50所述的融合蛋白质,其具有在野生型人IDS蛋白质的相应酶活性的80%-120%以内的IDS酶活性。

[0466] 52.如实施方案1所述的融合蛋白质,其包含图3A、图3B、图3C、图3D、图3E或图3F中所示的hIDUA融合蛋白质的氨基酸序列,实质上由或由所述氨基酸序列组成,任选地其中所述融合蛋白质实质上由或由SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列组成,其中m和n中的每一者=4。

[0467] 53.如实施方案1所述的融合蛋白质,其包含式I:AB-L1-RB-L2-C,其中AB包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5,实质上由或由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成,L1包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5,RB包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12,L1包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5,C包含SEQ ID NO:22的氨基酸27-653,实质上由或由SEQ ID NO:22的氨基酸27-653组成,并且L2包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5。

[0468] 54.如实施方案1所述的融合蛋白质,其包含式II:RB-L1-AB-L2-C,其中AB包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5,实质上由或由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成,L1包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5,RB包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12,L1包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5,包含SEQ ID NO:22的氨基酸27-653,实质上由或由SEQ ID NO:22的氨基酸27-653组成,并且L2包含(GGGGS) n ,实质上由或由(GGGGS) n 组成,其中 n 是4或5。

[0469] 55.如实施方案53或54所述的融合蛋白质,其中AB实质上由SEQ ID NO:5组成并且RB实质上由SEQ ID NO:12组成。

[0470] 56. 一种多核苷酸, 其包含编码以上实施方案中任一项所述的融合蛋白质的第一核苷酸序列。

[0471] 57. 如实施方案56所述的多核苷酸, 其中所述第一核苷酸序列可操作地连接至编码所述融合蛋白质的分泌信号序列的核苷酸序列, 任选地其中所述分泌信号序列实质上由或由 (i) MELGLSWVLAAL LQGVQA (SEQ ID NO:79) 或 (ii) 表5中所示的氨基酸序列中的一个氨基酸序列组成。

[0472] 58. 如实施方案57所述的多核苷酸, 其中所述分泌信号序列实质上由或由 MELGLSWVLAALLQGVQA (SEQ ID NO:79) 组成。

[0473] 59. 如实施方案56至58中任一项所述的多核苷酸, 其中所述第一核苷酸序列可操作地连接至启动子序列和polyA信号序列。

[0474] 60. 如实施方案59所述的多核苷酸, 其中所述启动子序列是图4A中所示的pCAG启动子序列、图4B中所示的EF1 α 启动子序列或图4C中所示的EFS启动子序列。

[0475] 61. 如实施方案60所述的多核苷酸, 其中所述启动子序列是图4B中所示的EF1 α 启动子序列。

[0476] 62. 如实施方案59至61中任一项所述的多核苷酸, 其中所述polyA信号序列是图5A中所示的rBG poly A信号序列、图5B中所示的SV40晚期poly A信号序列或图5C中所示的BGH poly A信号序列。

[0477] 63. 如实施方案62所述的多核苷酸, 其中所述polyA信号序列是图5A中所示的rBG poly A信号序列。

[0478] 64. 如实施方案56所述的多核苷酸, 其包含图7中所示的核苷酸序列。

[0479] 65. 如实施方案56至64中任一项所述的多核苷酸, 其是分离的双链DNA分子中的一条链。

[0480] 66. 一种经遗传修饰的哺乳动物细胞, 其用实施方案56至65中任一项所述的多核苷酸瞬时或稳定转染。

[0481] 67. 如实施方案66所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞, 其中所述多核苷酸被插入到所述哺乳动物细胞的基因组中的至少一个位置中。

[0482] 68. 如实施方案66或67所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞, 其中所述细胞衍生自人类细胞。

[0483] 69. 如实施方案68所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞, 其衍生自RPE细胞, 任选地ARPE-19细胞。

[0484] 70. 如实施方案68所述的经遗传修饰的哺乳动物细胞, 其衍生自诱导型多能干细胞 (iPSC) 或间充质干细胞。

[0485] 71. 一种组合物, 所述组合物包含多个经遗传修饰的细胞, 其中所述多个经遗传修饰的细胞中的每个细胞是如由实施方案68至70中任一项所限定的经遗传修饰的细胞。

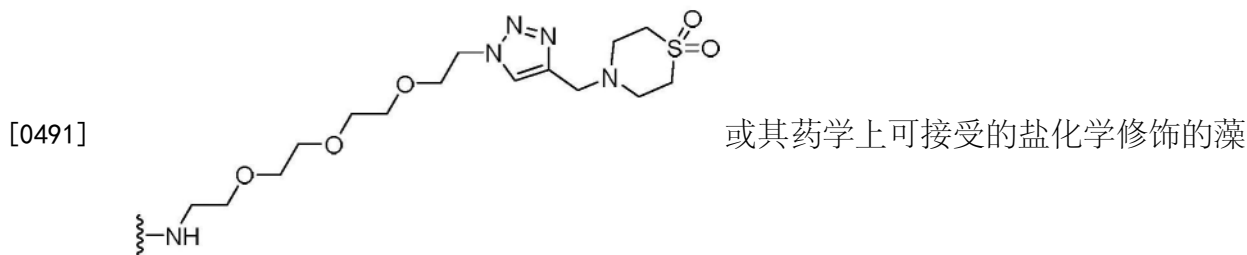
[0486] 72. 如实施方案71所述的组合物, 其中所述多个经遗传修饰的细胞是从单克隆细胞系的培养物获得。

[0487] 73. 一种可植入设备, 其包括至少一个含细胞隔室, 所述含细胞隔室包括实施方案66至70中任一项所述的经遗传修饰的细胞或实施方案71或72所述的组合物; 并且进一步包括至少一种用于在设备被植入到受试者中时减轻异物反应 (FBR) 的装置。

[0488] 74. 如实施方案74=3所述的可植入设备,其中所述含细胞隔室包括聚合物组合物,其中所述聚合物组合物包含用肽共价修饰的藻酸盐,其中所述肽实质上由或由GRGDSP (SEQ ID NO:89)、GGRGDSP (SEQ ID NO:90) 或GGGRGDSP (SEQ ID NO:91) 组成。

[0489] 75. 如实施方案73或74所述的可植入设备,其中所述含细胞隔室被屏障隔室围绕,所述屏障隔室包括藻酸盐水凝胶和任选的设置在所述屏障隔室的外表面上的式 (III) 化合物。

[0490] 76. 如实施方案74或75所述的可植入设备,其中所述聚合物组合物包含用肽共价修饰的藻酸盐,其中所述肽实质上由或由GRGDSP组成,并且其中所述屏障隔室包括用



酸盐。

[0492] 77. 如实施方案73至76中任一项所述的可植入设备,其是直径为约0.75mm至约2mm的球形两隔室水凝胶胶囊。

[0493] 78. 一种设备制剂,其中所述制剂中的每个设备均为实施方案73至77中任一项所述的设备。

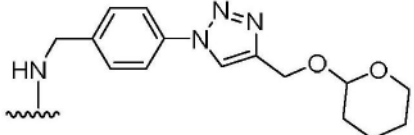
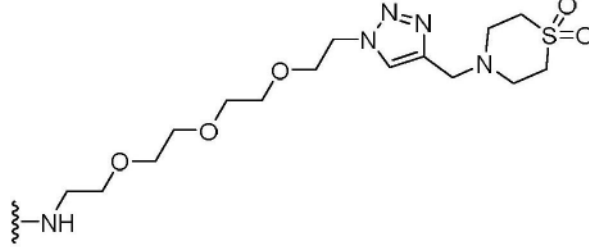
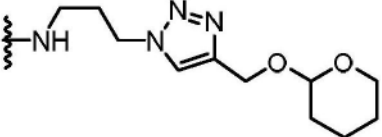
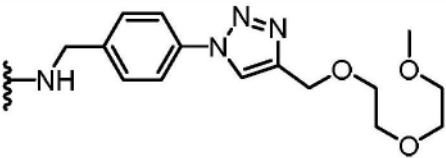
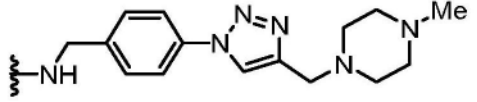
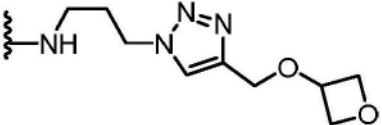
[0494] 79. 一种水凝胶胶囊,其包括:

[0495] (a) 内部隔室,所述内部隔室包括包封在第一聚合物组合物中的多个实施方案66至70中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述第一聚合物组合物包含形成水凝胶的聚合物;和

[0496] (b) 屏障隔室,所述屏障隔室围绕所述内部隔室并且包括第二聚合物组合物,其中所述第二聚合物组合物包含用至少一种式 (III) 化合物或其药学上可接受的盐共价修饰的藻酸盐。

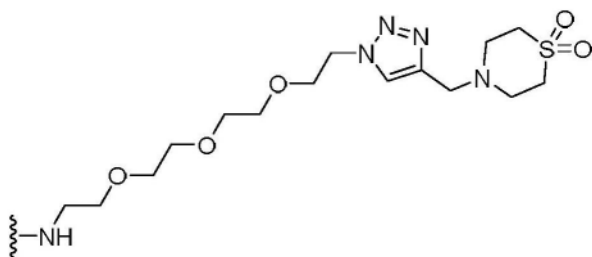
[0497] 80. 如实施方案79所述的水凝胶胶囊,其中所述式 (III) 化合物选自下表中提供的化合物:

[0498]

化合物编号	结构
100	
101	
110	
112	
113	
114	

[0499] 81. 如实施方案75或76所述的水凝胶胶囊,其中所选化合物为

[0500]



[0501] 82. 如实施方案79-81中任一项所述的水凝胶胶囊,其中所述内部隔室中的所述经遗传修饰的细胞的浓度是至少4000万个细胞/ml所述第一聚合物组合物。

[0502] 83. 一种胶囊组合物,其包含在药学上可接受的载体中的多个实施方案79至82中任一项所述的水凝胶胶囊。

[0503] 84. 如实施方案83所述的胶囊组合物,其中所述多个水凝胶胶囊中的经遗传修饰的细胞表达并分泌实施方案51所述的IDUA融合蛋白质。

[0504] 85. 一种药物组合物,其包含实施方案1至55中任一项所述的融合蛋白质和药学上可接受的载体。

[0505] 86. 如实施方案81所述的药物组合物,其中所述融合蛋白质是实施方案48所述的IDUA融合蛋白质。

[0506] 87.一种预防或治疗受试者的中枢神经系统(CNS)的疾病或疾患的方法,所述方法包括:

[0507] (i)向所述受试者施用实施方案85或86所述的药物组合物;

[0508] (ii)将实施方案73至78中任一项所述的设备或设备制剂植入所述受试者中;或

[0509] (iii)将实施方案83或84所述的胶囊组合物植入所述受试者中。

[0510] 88.一种治疗被诊断患有1型粘多糖贮积症(MPS-1)疾病的人受试者的方法,所述方法包括:

[0511] (a)提供实施方案86所述的胶囊组合物;以及

[0512] (b)将所述胶囊组合物设置于所述受试者的身体中。

[0513] 89.如实施方案88所述的方法,其中所述设置步骤包括将所述胶囊组合物放置于所述受试者的腹膜内间隙中。

[0514] 90.如实施方案88所述的方法,其中所述设置步骤包括将所述胶囊组合物放置于腹膜腔的大囊中。

[0515] 91.如实施方案87至90中任一项所述的方法,其中所述胶囊组合物产生BBB转运IDUA融合蛋白质,所述BBB转运IDUA融合蛋白质包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29,实质上由或由SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29组成。

[0516] 实施例

[0517] 为了可以更充分地理解本文所述的公开内容,阐述了以下实施例。提供本申请中描述的实施例是为了说明本文提供的BBB转运融合蛋白质、经遗传修饰的细胞、可植入设备和组合物以及方法,并且不应以任何方式解释为限制它们的范围。这些实施例中使用的MPS-1小鼠从Charles River Laboratory(Wilmington,MA)获得,并且在Idua密码子W392处携带无义突变(jackson Laboratory库存编号017681)。

[0518] 实施例1:将示例性IGF1R结合结构域与hIDUA融合对体外hIDUA活性的影响。

[0519] 将DNA表达载体工程化成编码六种不同的hIDUA融合酶,该hIDUA融合酶含有经由重复3、4或5次的可变长度的G4S接头单元与hIDUA开放阅读框的N末端或C末端融合的BBB-穿透性sdAb(IGF1R4)。用这些表达载体转染ARPE-19细胞,并且针对六种不同转染中的每一种产生了稳定表达hIDUA融合酶的多克隆集落。表达载体和经转染的细胞是基于复合模块的编码序列相对于彼此的取向而命名的。例如,hIDUA-(G4S)₃-IGF1R4细胞表达融合酶,其中IGF1R4经由重复3次的G4S接头与hIDUA的C末端融合。

[0520] 通过将来自每个多克隆集落的细胞以每孔2ml新鲜培养基中大约400,000个细胞接种到6孔组织培养板中来评估从六个多克隆集落分泌的hIDUA融合蛋白质的体外IDUA活性。二十至二十四小时后,收集条件细胞培养基并使用IDUA活性测定来测定IDUA蛋白质浓度,并与已知标准(拉罗尼酶)进行比较,基本上如Ou,L.等人,(2014).Standardization of α -L-iduronidase enzyme assay with Michaelis-Menten kinetics.Molecular Genetics and Metabolism,111(2),113-115中所述。简言之,在黑色96孔板中,将8ul细胞培养基添加至32ul的0.4M甲酸钠(pH 3.5)中。将在测定缓冲液中稀释的20ul的700um 4-甲基伞形酮基- α -L-艾杜糖醛酸苷添加到所有孔中。将板在37℃下孵育10分钟。为了终止反应,添加100ul终止溶液(0.5M NaOH+0.5M甘氨酸)。 α -L-艾杜糖醛酸酶催化非荧光底物(4MU-艾杜糖醛酸苷)裂解成荧光产物(4-MU)。在终点模式下,在Biotek Cytation 3上分别

在365nm和445nm的激发和发射波长(顶部读数)下测量荧光强度。将酶活性水平与用拉罗尼酶生成的标准曲线进行比较,并且结果示于图8中。产生了最高体外IDUA活性的多克隆培养物是表达IGF1R4-(G4S)₄-hIDUA融合酶的多克隆培养物。

[0521] 使用用于这种融合的表达载体对ARPE-19细胞进行新的转染,从中鉴定出具有更高hIDUA活性的多克隆池。将来自此池中的细胞以5000万个细胞/ml包封在有保护的胶囊的内部隔室中,实质上如W02020198696中所述。在五只MPS-1小鼠中的每一只的IP间隙中植入0.5ml胶囊的剂量。施用后28天,对小鼠实施安乐死,并评估肝和血浆组织样品中hIDUA活性的量。图8B示出与在基本相似的实验中观察到的典型hIDUA水平相比的测量的hIDUA活性水平,该实验中植入了包封被遗传修饰成表达并分泌野生型hIDUA的ARPE-19细胞的胶囊。这种比较表明,与植入产生野生型hIDUA的细胞相比,为MPS-1小鼠植入产生IGF1R4-hIDUA融合物的细胞不会导致更高的肝和血浆hIDUA活性。

[0522] 实施例2:将示例性HSA和IGF1R结合结构域与hIDUA融合对体外hIDUA活性的影响。

[0523] 将DNA表达载体工程化成编码六种不同的hIDUA融合酶,该hIDUA融合酶含有BBB穿透性sdAb(IGF1R5)、抗HSA sdAb(R28)和hIDUA的不同取向的开放阅读框,其中(G4S)₄氨基酸接头位于这些开放阅读框的每个开放阅读框之间。所评价的不同取向为:(i)2种融合物,其中sdAb均与hIDUA的N末端融合(N末端融合物);(ii)2种融合物,其中sdAb侧接hIDUA(侧接融合物);和(iii)2种融合物,其中sdAb均与hIDUA的C末端融合(C末端融合物)。用这些表达载体转染ARPE-19细胞,并且针对六种不同转染中的每一种产生了稳定表达hIDUA融合酶的多克隆集落。表达载体和经转染的细胞是基于复合模块的编码序列相对于彼此的取向而命名的。例如,IGF1R5-R28-hIDUA细胞表达融合酶,其中IGF1R5位于R28的N末端,该R28本身位于hIDUA的N末端。

[0524] 如实施例1中所述评估从6个多克隆集落分泌的hIDUA融合蛋白质的体外hIDUA活性,并且结果示于图9A中。表达N末端双重融合酶(IGF1R5-R28-hIDUA和R28-IGF1R5-hIDUA)的多克隆池比表达侧接融合物或C末端融合物的细胞系表现出更高的hIDUA活性水平,这一结果与实施例1中获得的hIDUA活性结果一致,实施例1中获得的hIDUA活性结果显示针对单一N末端融合物产生的hIDUA活性高于C末端融合物。出人意料地,N末端融合物中抗HSA和抗IGF1R sdAb的取向对hIDUA活性具有显著影响,其中含有位于IGF1R5上游的R28的融合物产生的hIDUA活性比含有位于R28上游的IGF1R-5的融合物高约50%。这六种细胞系中的每一种细胞系之间的活性差异具有统计学意义。

[0525] 为了评估添加HSA结合结构域是否影响融合蛋白质的hIDUA活性,将来自表现最好的双重融合多克隆池(R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA)的培养中的细胞的条件培养基中的体外hIDUA活性与来自用于实施例1中所述的MPS-1小鼠实验的IGF1R4-(G4S)₄-hIDUA多克隆池的培养中的细胞的条件培养基中的体外hIDUA活性进行比较。如图9B所示,在单一N末端和双重N末端融合培养物中hIDUA活性的量实质上没有差异。

[0526] 实施例3:HSA和IGF1R结合结构域对体内hIDUA活性的影响。

[0527] 将来自分泌R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA融合酶的多克隆池的细胞以5000万个细胞/ml包封于有保护的胶囊的内部隔室中,实质上如W02020198696中所述。在六只MPS-1小鼠(J)中的每一只的IP间隙中植入0.5ml胶囊的剂量。在施用后21天,对小鼠实施安乐死,并评估血浆和各种全身组织中hIDUA活性的量。

[0528] 图10示出与在基本相似的实验中观察到的典型hIDUA水平相比的测量的hIDUA活性水平,该实验中植入了包封被遗传修饰成表达并分泌野生型hIDUA的ARPE-19细胞的有保护的胶囊。与植入有表达野生型hIDUA酶的细胞的小鼠相比,植入有表达R28-IGF1R5-hIDUA融合酶的细胞的小鼠在组织(肾除外)和血浆中具有显著更高的hIDUA活性。

[0529] 实施例4:向MPS-1小鼠植入产生示例性BBB转运融合蛋白质的有保护的胶囊对脑硫酸乙酰肝素水平的影响。

[0530] 将包封来自分泌R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA融合酶的多克隆池的细胞的有保护的胶囊植入到六只MPS-1小鼠中的每一只的IP间隙内。观察作为对照的一组六只未经治疗的MPS-1小鼠。在施用后21天,对两组小鼠实施安乐死,并评估两个不同脑区域(海马和额叶)中的硫酸乙酰肝素的量。简言之,获得每个脑区域的组织匀浆,并将组织匀浆(10u1)与等体积的肝素酶混合液(cocktail)(肝素酶I、肝素酶II和肝素酶III在肝素酶反应缓冲液中的混合物)组合。各个肝素酶和肝素酶反应缓冲液来自New England Biolabs,目录号P0735S、P0736S、P0737S和B0735S。将反应物在37℃下孵育3天,并且通过LC/MS对所得硫酸乙酰肝素二糖进行定量。

[0531] 如图11所示,植入有分泌hIDUA BBB转运融合蛋白质的细胞的MPS-1小鼠的在这两种脑组织中的硫酸乙酰肝素与对照小鼠相比都具有统计学显著的减少。

[0532] 实施例5:具有不同取向的示例性HSA和IGF1R结合结构域的双重IDS融合物。

[0533] 将DNA表达载体工程化成编码两种不同的hIDS融合酶,这两种不同的hIDS融合酶含有用于BBB穿透性sdAb(IGF1R5)、抗HSA sdAb(R28)和hIDS的不同取向的开放阅读框,其中(G4S)₄氨基酸接头位于这些开放阅读框中的每个开放阅读框之间。所评价的不同取向是R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDS(例如,式I融合物)和IGF1R5-(G4S)₄-R28-(G4S)₄-hIDS(例如,式II融合物)。用两种表达载体中的一种表达载体转染ARPE-19细胞,并且针对两种转染中的每一种表达载体产生了稳定表达hIDS融合酶的多克隆集落。

[0534] 通过将来自每种细胞系的细胞以每孔2ml新鲜培养基中大约400,000个细胞接种到6孔组织培养板中来评估从每个多克隆池分泌的hIDS融合蛋白质的体外IDS活性。二十至二十四小时后,收集条件细胞培养基并使用2步酶促IDS活性测定来测定IDS蛋白质浓度,并与已知标准物(艾杜硫酸酯酶)进行比较。简言之,在黑色96孔板中,将3u1细胞培养基添加至15.6u1水和20u1含有20mM在0.2M乙酸钠(pH 5.0)中的乙酸铅(II)的缓冲液中。向所有孔添加1.4u1的20mM底物(在DMSO中重构的2-硫酸4-甲基伞形酮基- α -L-艾杜糖醛酸苷)。将板在37℃下孵育10分钟。为了淬灭第一个反应,向每个孔中添加40u1的补充有5ug/mL拉罗尼酶的2x McIlvaine缓冲液(0.40M磷酸钠、0.20M柠檬酸盐pH 4.5)。将板在37℃下孵育10分钟。为了终止第二个反应,添加了100u1终止溶液(0.5M NaOH+0.5M甘氨酸)。在第一个反应步骤中,底物(2-硫酸4MU- α -艾杜糖醛酸苷)被艾杜糖醛酸苷2-硫酸酯酶(IDS)水解为产物4MU-艾杜糖醛酸苷。在第二个反应步骤中,通过添加过量的磷酸盐来淬灭艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶活性,并且 α -L-艾杜糖醛酸酶催化第一个反应的非荧光产物(4MU-艾杜糖醛酸苷)裂解成荧光产物(4-MU)。在终点模式下,在Biotek Cytation 3上分别在365nm和445nm的激发和发射波长(顶部读数)下测量荧光强度。将酶活性水平与用艾杜硫酸酯酶生成的标准曲线进行比较,并且结果显示在图13中。表达R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDS(式I)双重融合酶的多克隆池比表达IGF1R5-(G4S)₄-R28-(G4S)₄-hIDS(式II)双重融合物的细胞系相比表现

出更高的hIDS活性水平,这一结果与实施例3中获得的hIDUA活性结果一致,实施例3中获得的hIDUA活性结果显示针对式I融合物(AB-L1-RB-L2-C)产生的hIDUA活性高于式II融合物(RB-L1-AB-L2-C)。

[0535] 实施例6:向MPS-1小鼠植入产生示例性BBB转运融合蛋白质的有保护的胶囊对全身组织中的硫酸乙酰肝素的的影响。

[0536] 将包封来自分泌R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA融合酶的多克隆池的细胞的有保护的胶囊植入到六只MPS-1小鼠中的每一只的IP间隙内。观察作为对照的一组六只未经治疗的MPS-1小鼠。在施用后21天,对这两组小鼠实施安乐死,并评估各种器官(肝、脾、肾、肺和心脏)中的硫酸乙酰肝素的量。简言之,获得器官组织匀浆,并将组织匀浆(10u1)与等体积的肝素酶混合液(肝素酶I、肝素酶II和肝素酶III在肝素酶反应缓冲液中的的混合物)组合。各个肝素酶和肝素酶反应缓冲液来自New England Biolabs,目录号P0735S、P0736S、P0737S和B0735S。将反应物在37℃下孵育3天,并且通过LC/MS对所得硫酸乙酰肝素二糖进行定量。

[0537] 如图14所示,用双重融合酶(黑色条形)治疗的MPS-1小鼠表现出肝、脾、肾、肺和心脏组织样品中的每一者中硫酸乙酰肝素水平的相对于未经治疗的小鼠(灰色条形)的统计学上显著的降低。

[0538] 实施例7:示例性BBB转运融合蛋白质的免疫原性潜力的评估。

[0539] 商业供应商(EpiVax, Providence, Rhode Island, USA)对以下分子进行了计算机模拟免疫原性评估:R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA融合酶;(2)R28-H5-(G4S)₄-IGF1R5-H2-(G4S)₄-hIDUA融合酶,其中R28-H5组分是具有氨基酸序列(SEQ ID NO:5)的人源化R28变体,并且IGF1R5-H2组分是具有氨基酸序列(SEQ ID NO:12)的人源化IGF1R5变体;(3)单独的原生人IDUA蛋白质(即未与任何其它分子融合);和(4)两种融合酶中存在的单个亲本和人源化sdAb。简言之,EpiVax使用其专有的EpiMatrix算法评价了包含针对预测的T细胞表位的分子的融合构建体的氨基酸序列以及单个物(individual)的氨基酸序列。根据预测的T细胞表位总含量对每种分子进行评分,并针对EpiMatrix蛋白质免疫原性量表对每种分子进行排名,其中可将该分子直接与具有已知免疫原性的蛋白质进行比较。如刚好位于下面的表格所示,所述融合酶中的每一种融合酶均具有比单独的原生hIDUA更低的预测免疫原性得分。

[0540]	分子	免疫原性得分	免疫原性风险级别
	R28	15.19	升高
	单独 hIDUA	6.19	中性
	R28-(G4S) ₄ -IGF1R5-(G4S) ₄ -hIDUA	-5.20	中性
	R28-H5-(G4S) ₄ -IGF1R5-H2-(G4S) ₄ -hIDUA	-14.08	中性
	IGF1R5	-22.32	低
	R28-H5	-32.63	低
	IGF1R5-H2	-46.54	低

[0541] 实施例8: 示例性人源化和骆驼科动物BBB转运融合蛋白质的体内比较。

[0542] 向三组MPS-1小鼠(每组6只小鼠)植入有保护的胶囊, 该有保护的胶囊包封来自分泌人源化IDUA融合蛋白质[R28-H5-(G4S)₄-IGF1R5-H2-(G4S)₄-hIDUA or IGF1R5-H2-(G4S)₄-R28-H5-(G4S)₄-hIDUA]或骆驼科动物IDUA融合蛋白质[R28-(G4S)₄-IGF1R5-(G4S)₄-hIDUA]的多克隆池的细胞。每种融合蛋白质中的IDUA氨基酸序列是同一的。观察作为对照的一组四只未经治疗的MPS-1小鼠。在施用后28天, 对所有小鼠队列实施安乐死, 并评估中脑中的硫酸乙酰肝素的量。简言之, 获得中脑组织匀浆, 并将组织匀浆(10ul)与等体积的肝素酶混合液(肝素酶I、肝素酶II和肝素酶III在肝素酶反应缓冲液中的混合物)组合。各个肝素酶和肝素酶反应缓冲液来自New England Biol abs, 目录号P0735S、P0736S、P0737S和B0735S。将反应物在37℃下孵育3天, 并且经由LC/MS对所得硫酸乙酰肝素二糖进行定量。如图15所示, 用三种双重融合酶(灰色条形)中的任一种治疗的MPS-1小鼠表现出中脑中硫酸乙酰肝素水平的相对于未经治疗的小鼠(黑色条形)的统计学上显著的降低。经治疗的小鼠队列之间中脑硫酸乙酰肝素减少没有统计学上显著的差异。

[0543] 等效物和范围

[0544] 本申请提到各种授权的专利、公布的专利申请、杂志文章和其它出版物, 它们全部以引用的方式并入本文中。如果任何并入的参考文献与本说明书之间存在冲突, 则应以说明书为准。此外, 在现有技术内的本公开的任何特定实施方案可从任一个或多个权利要求中明确排除。因为认为此类实施方案为本领域普通技术人员所知的, 即使本文没有明确阐述排除, 也可排除它们。本公开的任何特定实施方案都可出于任何原因从任何权利要求中排除, 无论是否涉及现有技术存在。

[0545] 本领域的技术人员将认识到或仅仅使用常规实验就能够确定本文所描述的具体实施方案的许多等效物。本文描述的本发明实施方案的范围不意图限于以上说明书、附图或实施例, 而是如在所附权利要求中所阐述的。本领域的普通技术人员将了解, 可在不偏离本公开的精神或范围的情况下对本说明书进行各种变化和修改, 如以下权利要求书中所限定的。

人前体GAA (SEQ ID NO:15)

10	20	30	40	50
MGVRHPPCSH	RL LAVCALVS	LATAALLGHI	LLHDFLLVPR	ELSGSSPVLE
60	70	80	90	100
ETHPAHQQGA	SRPGPRDAQA	HPGRPRAVPT	QCDVPPNSRF	DCAPDKAITQ
110	120	130	140	150
EQCEARGCCY	IPAKQGLQGA	QMGQPWCFFP	PSYPSYKLEN	LSSSEMGYTA
160	170	180	190	200
TLTRTTPTFF	PKDILTLRLD	VMMETENRLH	FTIKDPANRR	YEVPLETPHV
210	220	230	240	250
HSRAPSPLYS	VEFSEEPFGV	IVRRQLDGRV	LLNTTVAPLF	FADQFLQLST
260	270	280	290	300
SLPSQYITGL	AEHLSPLMLS	TSWTRITLWN	RDLAPTPGAN	LYGSHPFYLA
310	320	330	340	350
LEDGGSAGHV	FLSNSNAMDV	VLQPSPALSW	RSTGGILDVY	IFLGPEPKSV
360	370	380	390	400
VQQYLDVVG	PFMPYWGGLG	FHLCRWGYSS	TAITRQVVEN	MTRAHFPLDV
410	420	430	440	450
QWNDLDYMDS	RRDFTFNKDG	FRDFPAMVQE	LHQGGRRYMM	IVDPAISSSG
460	470	480	490	500
PAGSYRPYDE	GLRRGVFITN	ETGQPLIGKV	WPGSTAFPDP	TNPTALAWWE
510	520	530	540	550
DMVAEFHDQV	PFDGMWIDMN	EPSNFIRGSE	DGCPNNELEN	PPYVPGVVGG
560	570	580	590	600
TLQAATICAS	SHQFLSTHYN	LHNLYGLTEA	IASHRALVKA	RGTRPFVISR
610	620	630	640	650
STFAGHGRYA	GHWTGDVWSS	WEQLASSVPE	ILQFNLLGVP	LVGADVCGFL
660	670	680	690	700
GNTSEELCVR	WTQLGAFYPF	MRNHNSLLSL	PQEPYSFSEP	AQQAMRKALT
710	720	730	740	750
LRYALLPHLY	TLFHQAHVAG	ETVARPLFLE	FPKDSSTWTV	DHQLLWGEAL
760	770	780	790	800
LITPVLQAGK	AEVTGYFPLG	TWYDLQTPVP	EALGSLPPPP	AAPREPAIHS
810	820	830	840	850
EGQWVTL PAP	LDTINVHLRA	GYIIPLOQPG	LTTTESRQQP	MALAVALT KG
860	870	880	890	900
GEARGELFWD	DGESLEVLER	GAYTQVIFLA	RNNTIVNELV	RVTSEGAGLQ
910	920	930	940	950
LQKVTVLGVA	TAPQQVLSNG	VPVSNFTYSP	DTKVLDICVS	LLMGEQFLVS

WC

图1A

人前体GBA (SEQ ID NO:16)

10	20	30	40	50
MEFSSPSREE	CPKPLSRVSI	MAGSLTGLLL	LQAVSWASGA	RPCIPKSFY
60	70	80	90	100
SSVVCVCNAT	YCDSFDPPTF	PALGTFSRYE	STRSGRMEL	SMGPIQANHT
110	120	130	140	150
GTGLLLTLQP	EQKFQKVKG	GGAMTDAAAL	NILALSPPAQ	NLLLKSYFSE
160	170	180	190	200
EGIGYNIIRV	PMASCDFSIR	TYTYADTPDD	FQLHNFSLPE	EDTKLKIPLI
210	220	230	240	250
HRALQLAQR	VSLASPWTS	PTWLKTNGAV	NGKGSCLKGP	GDIYHQTWAR
260	270	280	290	300
YFVKFLDAYA	EHKLQFWAVT	AENEPSAGLL	SGYPFQCLGF	TPEHQRFIA
310	320	330	340	350
RDLGPTLANS	THHNVRLML	DDQRLLLPHW	AKVVLTDPEA	AKYVHGI AVH
360	370	380	390	400
WYLDLFLAPAK	ATLGETHRLF	PNTMLFASEA	CVGSKFWEQS	VRLGSWDRGM
410	420	430	440	450
QYSHSIITNL	LYHVVGWTDW	NLALNPEGGP	NWVRNFVDSP	IIVDITKDTF
460	470	480	490	500
YKQPMFYHLG	HFSKFIPEGS	QRVGLVASQK	NDLDAVALMH	PDGSAVVVVL
510	520	530		
NRSSKDVPLT	IKDPAVGFL	TISPGYSIHT	YLWRRQ	

图1B

人前体GLA (SEQ ID NO:17)

10	20	30	40	50
MQLRNPELHL	GCALALRFLA	LVSWDIPGAR	ALDNGLARTP	TMGWLHWERF
60	70	80	90	100
MCNLDCQEEP	DSCISEKLFM	EMAELMVSEG	WKDAGYEYLC	IDDCWMA PQR
110	120	130	140	150
DSEGRLQADP	QRFPHGIRQL	ANYVHSGGLK	LGIYADVGNK	TCAGFPGSFG
160	170	180	190	200
YYDIDAQTFA	DWGVDLLKFD	GICYDSLLENL	ADGYKHMSLA	LNRTGRS IVY
210	220	230	240	250
SCEWPLYMWP	FQKPNYTEIR	QYCNHWRNFA	DIDDSWKS IK	SILDWTS FNQ
260	270	280	290	300
ERIVDVAGPG	GWNDPDM LVI	GNFGLSWNQ	VTQMALWAIM	AAPLFMSNDL
310	320	330	340	350
RHISPQAKAL	LQDKDVIAIN	QDPLGKQGYQ	LRQGDNF EVW	ERPLSGLAWA
360	370	380	390	400
VAMINRQEIG	GPRSYTIAVA	SLGKG VACNP	ACFITQLLPV	KRKLGFYEWT
410	420			
SRLRSHINPT	GTVLLQLENT	MQMSLKDLL		

图1C

人前体GNS (SEQ ID NO:18)

10	20	30	40	50
MRLPLAPGR	LRRGSPRHL	SCSPALLLV	LGGCLGVFGV	AAGTRRPNVV
60	70	80	90	100
LLLTDDQDEV	LGGMTPLKKT	KALIGEMGMT	FSSAYVPSAL	CCPSRASILT
110	120	130	140	150
GKYPHNHHVV	NNTLEGNCSS	KSWQKIQEPN	TFPAILRSMC	GYQTFFAGKY
160	170	180	190	200
LNEYGAPDAG	GLEHVPLGWS	YWYALEKNSK	YYNYTLSING	KARKHGENYS
210	220	230	240	250
VDYLTDLVLAN	VSLDFLDYKS	NFEPFFMMIA	TPAPHSPWTA	APQYQKAFQN
260	270	280	290	300
VFAPRNKNFN	IHGINKHWLI	RQAKTPMTNS	SIQFLDNAFR	KRWQTLLSVD
310	320	330	340	350
DLVEKLVKRL	EFTGELNNTY	IFYTSDNGYH	TGQFSLPIDK	RQLYEFDIKV
360	370	380	390	400
PLLVRGPGIK	PNQTSKMLVA	NIDLGPTILD	IAGYDLNKTQ	MDGMSLLPIL
410	420	430	440	450
RGASNLTWRS	DVLVEYQGEG	RNVTDPTCPS	LSPGVSQCFP	DCVCEDAYNN
460	470	480	490	500
TYACVRTMSA	LWNLQYCEFD	DQEVFVEVYN	LTADPDQITN	IAKTIDPELL
510	520	530	540	550
GKMNYRLMML	QSCSGPTCRT	PGVFDPGYRF	DPRLMFSNRG	SVRTRRF SKH

LL

图1D

人前体GUSB (SEQ ID NO:19)

10	20	30	40	50
MARGSAVAWA	ALGPLLWGCA	LGLQGGMLYP	QESPSRECKE	LDGLWSFRAD
60	70	80	90	100
FSDNRRRGFE	EQWYRRPLWE	SGPTVDMVPV	SSFNDISQDW	RLRHFGVGVW
110	120	130	140	150
YEREVILPER	WTQDLRTRVV	LRIGSAHSYA	IVWVNGVDTL	EHEGGYLPFE
160	170	180	190	200
ADISNLVQVG	PLPSRLRITI	AINNTLTPTT	LPPGTIQYLT	DTSKYPKGYF
210	220	230	240	250
VQNTYFDFFN	YAGLQRSVLL	YTTPTTYIDD	ITVTTSVEQD	SGLVNYQISV
260	270	280	290	300
KGSNLFKLEV	RLLDAENKVV	ANGTGTQGQL	KVPGVSLWWP	YLMHERPAYL
310	320	330	340	350
YSLEVQLTAQ	TSLGPVSDFY	TLPVGIRTVA	VTKSQFLING	KPFYFHGVNK
360	370	380	390	400
HEDADIRGKG	FDWPLLVKDF	NLLRWLGANA	FRTSHYPYAE	EVMQMCDRYG
410	420	430	440	450
IVVIDECPGV	GLALPQFFNN	VSLHHMQVM	EEVVRRDKNH	PAVVMWSVAN
460	470	480	490	500
EPASHLESAG	YYLKMVIAHT	KSLDPSRPVT	FVSNSNYAAD	KGAPYVDVIC
510	520	530	540	550
LNSYYSWYHD	YGHLELIQLQ	LATQFENWYK	KYQKPIIQSE	YGAETIAGFH
560	570	580	590	600
QDPPLMFTEE	YQKSLLEQYH	LGLDQKRRKY	VVGELIWNFA	DFMTEQSPTR
610	620	630	640	650
VLGNKKGIFT	RQRQPKSAAF	LLRERYWKIA	NETRYPHSVA	KSQCLENLFL

T

图1E

人前体HGSNAT (SEQ ID NO:20)

10	20	30	40	50
MTGARASAAE	QRRAGRSGQA	RAAERAAGMS	GAGRALAALL	LAASVLSAAL
60	70	80	90	100
LAPGGSSGRD	AQAAPPRDL	KKRHAEKMD	QALLLIHNEL	LWTNLTVYWK
110	120	130	140	150
SECCYHCLFQ	VLVNVPQSPK	AGKPSAAAAS	VSTQHGSILQ	LNDTLEEKEV
160	170	180	190	200
CRLEYRFGF	GNYSLLVKNI	HNGVSEIACD	LAVNEDPVDS	NLPVSIAFLI
210	220	230	240	250
GLAVIIVISF	LRLLSLDDF	NNWISKAISS	RETDRLINSE	LGSPSRTDPL
260	270	280	290	300
DGDVQPATWR	LSALPPRLRS	VDTRFGIALI	LMVFNYYGGG	KYWFYFKHASW
310	320	330	340	350
NGLTVADLVF	PWFVFIMGSS	IFLSMTSILQ	RGCSKFRLLG	KIAWRSFLLI
360	370	380	390	400
CIGIIIVNPN	YCLGPLSWDK	VRIPGVLQRL	GVTYFVAVL	ELLFAKPVPE
410	420	430	440	450
HCASERSCLS	LRDITSSWPQ	WLLILVLEGL	WLGLTFLLPV	PGCPTGYLGP
460	470	480	490	500
GGIGDFGKYP	NCTGGAAGYI	DRLLLGDDHL	YQHPSSAVLY	HTEVAYDPEG
510	520	530	540	550
ILGTINSIVM	AFLGVQAGKI	LLYYKARTKD	ILIRFTAWCC	ILGLISVALT
560	570	580	590	600
KVSENEGFI	VNKNLWSLSY	VTTLSSFAFF	ILLVLYPVVD	VKGLWTGTPF
610	620	630	640	650
FYPGMNSILV	YVGHEVFENY	FPPQWKLKDN	QSHKEHLTQN	IVATALWVLI
660				
AYILYRKKIF	WKI			

图1F

人前体IDS (SEQ ID NO:21)

10	20	30	40	50
MPPPRTRGRL	LWLGLVLSSV	CVALGSETQA	NSTTDALNVL	LIIVDDL RPS
60	70	80	90	100
LG CYGDKLVR	SPNIDQLASH	SLLFQNAFAQ	QAVCAPSRVS	FLTGRRPDTT
110	120	130	140	150
RLYDFNSYWR	VHAGNFSTIP	QYFKENGYVT	MSVGKVFHPG	ISSNHTDDSP
160	170	180	190	200
YSWSFPPYHP	SSEKYENTKT	CRGPDGELHA	NLLCPVDVLD	VPEGTL PDKQ
210	220	230	240	250
STEQA IQLLE	KMKTSASPFF	LAVGYHKPHI	PFRYPKEFQK	LYPLENITLA
260	270	280	290	300
PDPEVPDGLP	PVAYNPWMDI	RQREDVQALN	ISVPYGPIPV	DFQRKIRQSY
310	320	330	340	350
FASVSYLDTQ	VGRLLSALDD	LQLANSTIIA	FTSDHGWALG	EHGEWAKYSN
360	370	380	390	400
FDVATHVPLI	FYVPGRTASL	PEAGEKLFY	LDPFDSASQL	MEPGRQSM DL
410	420	430	440	450
VELVSLFPTL	AGLAGLQVPP	RCPVPSFHVE	LCREGKNLLK	HFRFRDLEED
460	470	480	490	500
PYLPGNPREL	IAYSQYPRPS	DIPQWNSDKP	SLKDIKIMGY	SIRTIDYRYT
510	520	530	540	550
VWVGFN PDEF	LANFSDIHAG	ELYFVDS DPL	QDHNMYNDSQ	GGDLFQL LMP

图1G

人前体IDUA (SEQ ID NO:22)

10	20	30	40	50
MRPLRPRAAL	LALLASLLAA	PPVAPAEAPH	LVHVDAARAL	WPLRRFWRST
60	70	80	90	100
GFCPPLPHSQ	ADQYVLSWDQ	QLNLAYVGAV	PHRGIKQVRT	HWLLELVTTR
110	120	130	140	150
GSTGRGLSYN	FTHLDGYLDL	LRENQLLPGF	ELMGSASGHF	TDFEDKQQVF
160	170	180	190	200
EWKDLVSSLA	RRYIGRYGLA	HVSKWNFETW	NEPDHHDFDN	VSMTMQGFLN
210	220	230	240	250
YYDACSEGLR	AASPALRLGG	PGDSFHTPPR	SPLSWGLLRH	CHDGTNFFTG
260	270	280	290	300
EAGVRLDYIS	LHRKGARSSI	SILEQEKVVA	QQIRQLFPKF	ADTPIYNDEA
310	320	330	340	350
DPLVGWSLPQ	PWRADVITYAA	MVVKVIAQHQ	NLLLANTTSA	FPYALLSNDN
360	370	380	390	400
AFLSYHPPHF	AQRTLTAHFQ	VNNTRPPHVQ	LLRKPVLTAM	GLLALLDEEQ
410	420	430	440	450
LWAEVSQAGT	VLDSNHTVGV	LASAHRPQGP	ADAWRAAVLI	YASDDTRAHP
460	470	480	490	500
NRSVAVTLRL	RGVPPGGLV	YVTRYLDNGL	CSPDGEWRRL	GRPVFPTAEQ
510	520	530	540	550
FRRMRAAEDP	VAAAPRPLPA	GGRLTLRPAL	RLPSLLLHVH	CARPEKPPGQ
560	570	580	590	600
VTRLRALPLT	QGQLVLVWSD	EHVGSKCLWT	YEIQFSQDGK	AYTPVSRKPS
610	620	630	640	650
TFNLFVFSPP	TGAVSGSYRV	RALDYWARPG	PFSDPVPPYLE	VPVPRGPPSP

GNP

图1H

人前体NAGLU (SEQ ID NO:23)

10	20	30	40	50
MEAVAVAAAV	GVLLLAGAGG	AAGDEAREAA	AVRALVARLL	GPGPAADFSV
60	70	80	90	100
SVERALAAKP	GLDTYSLGGG	GAARVRVRGS	TGVAAAAGLH	RYLRDFCGCH
110	120	130	140	150
VAWSGSQRL	PRPLPAVPGE	LTEATPNRYR	YYQNVCTQSY	SFVWWDWARW
160	170	180	190	200
EREIDWMALN	GINLALAWSG	QEAIWQRVYL	ALGLTQAEIN	EFFTGPAFLA
210	220	230	240	250
WGRMGNLHTW	DGPLPPSWHI	KQLYLQHRVL	DQMRSEGMTP	VLPFAFAGHVP
260	270	280	290	300
EAVTRVFPQV	NVTKMGSWGH	FNCSYSCSFL	LAPEDPIFPI	IGSLFLRELI
310	320	330	340	350
KEFGTDHIYG	ADTFNEMQPP	SSEPSYLAAS	TTAVYEAMTA	VDTEAVWLLQ
360	370	380	390	400
GWLFQHQPF	WGPAQIRAVL	GAVPRGRLLV	LDLFAESQPV	YTRTASFQGG
410	420	430	440	450
PFIWCMLHNF	GGNHGLEFAL	EAVNGGPEAA	RLFPNSTMVG	TGMAPEGISQ
460	470	480	490	500
NEVVYSLMAE	LGWRKDPVPD	LAAWVTSFAA	RRYGVSHPPA	GAAWRLLLRS
510	520	530	540	550
VYNCSGEACR	GHNRSPLVRR	PSLQMNTSIW	YNRSDVFEAW	RLLLTSAAPSL
560	570	580	590	600
ATSPAIFYDL	LDLTRQAVQE	LVSLEYEEAR	SAYLSKELAS	LLRAGGVLAY
610	620	630	640	650
ELLPALDEVL	ASDSRFLGGS	WLEQARAAAV	SEAEADFYEQ	NSRYQLTLWG
660	670	680	690	700
PEGNILDYAN	KQLAGLVANY	YTPRWRLFLE	ALVDSVAQGI	PFQQHQFDKN
710	720	730	740	
VFQLEQAFVL	SKQRYPSQPR	GDTVDLAKKI	FLKYYPRWVA	GSW

图1I

人前体SGSH (SEQ ID NO:24)

10	20	30	40	50
MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL
60	70	80	90	100
DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNMGMYG	LHQDVHFFNS
110	120	130	140	150
FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPEP	VYPFDFAYTE	ENGSVLQVGR
160	170	180	190	200
NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG
210	220	230	240	250
ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV
260	270	280	290	300
GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSPE
310	320	330	340	350
HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP	TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP
360	370	380	390	400
ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDC
410	420	430	440	450
DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELVD	RSRDPHETQN
460	470	480	490	500
LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN

EL

图1J

(SEQ ID NO:25)

MKSGSGGGSP TSLWGLLFLS AALS~~L~~WPTSG EICGPGIDIR NDYQQLKRLE NCTVIEGYLH
 ILLISKAEDY RSYRFPKLTIV ITEYLLLLFRV AGLES~~L~~GD~~L~~F PNLTVIRGWK LFYNYALVIF
 EMTNLKD~~I~~GL YNLRNITRGA IRIEKNADLC YLSTVDWSLI LDAVSNNYIV GNKPPKECGD
 LCPGTME~~E~~KP MCEKTTINNE YNYRCWTTNR CQKMC~~P~~STCG KRACTENNEC CHPECLGSCS
 APDNDTACVA CRHYYYAGVC VPACPPNTYR FEGWRCVDRD FCANILSAES SDSEGEFVIHD
 GECMQECPSG FIRNGSQSMY CIPCEGPCPK VCEEEKTKT IDS~~V~~TS~~A~~QML QGCTIFKGNL
 LINIRRGNNI ASELENFMGL IEVVTGYVKI RSHALVSLS FLKNLRLILG EEQLEGNYSF
 YVL~~D~~NQNLQQ LWD~~D~~HRNLT IKAGKMYFAF NP~~K~~LCVSEIY RMEEV~~T~~G~~T~~KG RQSKGDINTR
 NNGERAS~~C~~ES DVLHFTSTTT SKNRIITWH RYRPPDYRDL ISFTVYYKEA PFKNVTEYDG
 QDACGSNSWN MVDVDLPPNK DVEPGILLHG LK~~P~~WTQYAVY VKAVTLT~~M~~VE NDHIRGAKSE
 ILYIRTNASV PSIPLDVLSA SNSSQLIVK WNPPSLP~~N~~GN ~~L~~SYIIVRWQR QPQDGYLYRH
 NYCSKD~~K~~IP~~I~~ RKYADGTIDI EEVTENPKTE VCGGEKGPCC ACPKTEAEKQ AEKEEAEYRK
 VFENFLHNSI FVPRPE~~rkr~~ DVMQVANTTM SSRSRNTTAA DTYNITDPEE LETE~~Y~~PF~~F~~ES
 RVDNKERTVI SNLRPF~~T~~LYR IDIHSCN~~H~~EA EKLGCSASN~~F~~ VFARTMPAEG ADDIPGPVTW
 EPRPENSIFL KWPEPENPNG LILMYEIKYG SQVEDQRECV SRQ~~E~~YRK YGG AKLNRLNPGN
 YTARIQATSL SNGGSWTDPV FFYVQAKTGY ENFIHLIIAL PVA~~V~~LLI VGG LVIMLYVFHR
 KRNN~~S~~RLNG VLYASVNPEY FSAADVYVPD EWEVAREKIT MSRELQGSF GMVYEGVAKG
 VVKDEPETRV AIKTVNEAAS MRERIEFLNE ASVMKEFNCH HVVRLLG VVS QGQPTLVIME
 LMTRGDLKSY LRSLRP~~E~~MEIN NPVLAPPSLS KMIQ~~M~~AGEIA DGMAYLNANK FVHRDLAARN
 CMVAEDFTVK IGDFGMTRDI YETDYYRKGG KGLLPVRWMS PESLKDGVFT TYSDVWSFGV
 VLWEIATLAE QPYQGLSNEQ VLRFVMEGGL LDKPDNCPDM L~~F~~ELMRMCWQ YNPKMRPSFL
 EIISSIKEEM EPGFREVSFY YSEENKLPEP EELDLEPENM ESVP~~L~~DP SAS SSSLPLPDRH
 SGHKAENGPG PGVLVL~~R~~ASF DERQPYAHMN GGRKNERALP LPQSSTC

图2A

(SEQ ID NO:26): R28-(GGGGS)m-IGF1R5-(GGGGS)n-IDUA, 其中m和n独立地= 4或5

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAITNEAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTALYCAADRSAQTMQRQVRPVLPLYWGQGTQVTVSS (GGGS)_m QVKLEES
 GGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGK
 TMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (GGGS)_n EAPHLVHVDAAARALWP
 LRRFWRSTGFCPPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLA YVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNFT
 HLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSA SGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLARRY IGRYGLAHVSKWNFETWNE
 PDHHD FDNVSM TMQGFLNYDDACSEGLRAAS PALRLGGPGDSEHTPPRSPL SWGLLRHCHDGTNFFTGEA
 GVRLLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVITYAAMV
 VKVIAQHQNLLANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGL
 LALLDEEQ LWAEV SQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRG
 VPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVFTAEQFRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRL
 PSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGLVLVWSDEHVGSKCLWYIEIQFSQDGKAYTPVSRKPSFT
 NLFVFSPTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGPNP

图3A

(SEQ ID NO:27): R28-(GGGGS)_n-IGF1R3-(GGGGS)_n-IDUA, 其中m和n独立地= 4或5

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWERQAPGKEREFVAAI TNFAGGTTYADSVKGRFT
ISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTALYYCAADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGTQVTVSS (GGGS)_mQVKLEES
GGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFIYAMSWERQAPGKEREFVAGVSRDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNAKN
TVDLQMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGTQVTVSS (GGGS)_nEAPHLVHVDAARA
LWPLRRFWRSTGFCPPPLPHSQADQYVLSWDQQNLNLA YVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSY
NFTHL DGYLDLLRENQLLPGFELMGSA SGHFTDEEDKQQVF EWKDLVSSLAR RYIGRYGLAHVSKWNFET
WNEPDHDFDNVSM TMQGFLNYYDACSEGLRAAS PALRLGGPGDSEHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFT
GEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPPWRADVITYA
AMVVKVIAQHQNLL LANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHPPHFAQRTLTAREQVNNTRPPHVQLLRKPVLT
MGLLALLDEEQ LWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLI YASDDTRAHPNRSVAVTLR
LRGVPPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRR LGRPVFP TAEQFRRMR AAEDEP VAAAPRPLPAGGRLTLRPA
LRLPSLLLHVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKP
STENLFVFSPTGTGAVSGSYRVRALDYWARPGFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

图3B

(SEQ ID NO:28): R28-(GGGGS)m-IGF1R4-(GGGGS)n-IDUA, 其中m和n独立地=4或5

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFIAYAMGWFRAQPKEREFEVAAITNFAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVY LQMNSLKPEDTALYYCAADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGTQVTVSS (GGGGS)_mQVKLEES
 GGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVPSTAMGWFRAQPKEREFEVGHITWSRGTTTRVASSVKDRFTISRDSAKN
 TVY LQMNSLKSEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (GGGGS)_nEAPHLVHVDAAARALWP
 LRRFWRSTGFCPPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTRGSTGRGLSYNFT
 HLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSA SGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSS LARRY IGRYGLAHVSKWNFFETWNE
 PDHHD FDNVSM TMQGF LNY YDACSEGLRAASPAIRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTTGEA
 GVRLDYISLHRK GARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPPWRADVITYAAMV
 VKVIAHQNL LANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHHPHFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGL
 LALLDEEQ LWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLLRLRG
 VPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVFP TAEQFRMRMAEDPVAAAPRPLPAGGRLLTLRPALRL
 PSLLL VHVCA RPEKPPGQVTRLRALPLTQQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPS TF
 NLFVESPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDVPYPYLEVPVPRGPPSPGNP

图3C

(SEQ ID NO:29): R28-H5-(GGGGS)m-IGF1R5-H2-(GGGGS)n-IDUA, 其中m和n独立地= 4或5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWFRQAPGKEREFVAAI TNFAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMRQVRPVL PYWGQGLTVTVSS (GGGS)_m QVQLVES
 GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKN
 TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DVARYDWGQGLTVTVSS (GGGS)_n EAPHLVHVDAARALWPL
 RRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGVAVPHRGIKQVRTHWLL ELVTTRGSTGRGLSYNFTH
 LDGYLDLLRENQLLPGFELMGSSASGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLARRYI GRYGLAHVSKWNFETWNEP
 DHHDFDNVSMTMQGFNLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSEHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAG
 VRLDYISLHRKGARSSISLLEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLV GWSLPQPPWRADVITYAAMVV
 KVIAQHQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPPFAQRTLTARFQVNNT RPPHVQLLRKPVLTAMGLL
 ALLDEEQWLWAEVSAQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASD DTRAHPNRSVAVTLRLRGV
 PPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLLGRPVFPPTAEQFERRMRAAEDPVAAA PRPLPAGGRLTLRPFALRLP
 SLLLVHVCARPEKPPGVTRLRALPLTQQQLVLVWSDEHVGSKCLWTEI IQFSQDGKAYTFVSRKPFSTFN
 LFVFSPTGTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

图3D

(SEQ ID NO:30): R28-H5-(GGGGS)m-IGF1R3-H5-(GGGGS)n-IDUA, 其中 m 和 n 独立地 = 4 或 5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTTFIAYAMGWRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMRQVRPVLPLYWGQGLTVTVSS (GGGS)_mEVQLVES
 GGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNIFYAMSWERQAPGKEREFVSGVSRDGLTTLYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGLTVTVSS (GGGS)_nEAPHLVHVDAARA
 LWPLRRFRWRTGFCPPPLPHSQADQYVLSWDQQNLNLA YVGAVPHRGIKQVIRTHWLLLELVTTTRGSTGRGLSY
 NFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSA SGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLAR RYIGRYGLAHVSKWNFFET
 WNEPDHDFDNVSMTMQGLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFT
 GEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPPWRADVITYA
 AMVVKVIAQHQNLLLANTTSAPFYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTAREQVNNTRPPHVQLLLRKPVLTA
 MGLLALLDEEQWLAEVSAQTVDLSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLR
 LRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFP TAEQFRMRRAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPA
 LRLPSLLLVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKP
 STENLFVFSPTGTGAVSGSYRVRALDYWARPGFSDPVYPYLEVPVFRGPPSPGNP



(SEQ ID NO:31): R28-H5-(GGGGS)m-IGF14-H2-(GGGGS)n-IDUA, 其中m和n独立地= 4或5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTEIAYAMGWFRAQPKEREFVAAITNEAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADRSQAQTMQRQVRPVLPLYWGQGLTVTVSS (GGGS)_n QVQLVES
 GGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWVRQAQPKGLEWVGHIITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDN SKN
 TVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGLTVTVSS (GGGS)_n EAPHLVHVDAAARALWP
 LRFEWRSTGFCPPPLPHSQADQYVLSWDQQNLNLA YVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNFT
 HLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSA SGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLARRY IGRYGLAHVSKWNFE TTWNE
 PDHHD FDNVSM TMQGF LNY YDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEA
 GVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPPWRADV TYAAMV
 VKVIAQHQNLLLANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHPPHFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGL
 LALLDEEQ LWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVT LRLRG
 VPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRRLGRPVFPTAEQFERMRMAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPA LRL
 PSLLL VHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGLVLVWSDEHVGSKCLWY EIQFSQDGKAYTPVSRKPS TF
 NLFVFS PDTGAVSGSYRVRA LDYWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP

图3F

(SEQ ID NO:32): pCAG启动子

CTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT TAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTCCCGGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGACCTTCCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTAATGCCCAGTACATGACCTTAATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGTCTCACTCTCCCCA
TCTCCCCCCTCCCAACCCCAATTTGTATTATTATTAAATTAATTTTGTGACGCGATGGGGC
GGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGA
GGTGGGGGGCAGCCAAATCAGAGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTATGCGGAGCGCGGGCGGGCGGCTC
GGCCATATAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGAGTCTGCTGCGCTGCCCTTCCGCCCTGCTGCCCGCTC
CGCGCGCCCTCGCGCCCGCCCGCTCTGACTGACCGCTTACTCCACAGGTGAGCGGGGGGGGAC
GGCCCTTCTCTCCGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTG
AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGGCTCGGGGGTGCCTGTGTGT
GTGCGTGGGAGCGCGCGTGGGCTCCCGCTGCCCGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGGGGGGGGG
CTTTGTGCGCTCCGCGAGTGTGCGGAGGGAGCGCGCGGGGGGGTGCCTCCCGGTGCGGGGGGGGCT
GCGAGGGGAACAAAGCTGCGTGGGGTGTGCTGCGTGGGGGGTGAAGAGGGGTGTGGCGCGCTCGGT
CGGCTGCAACCCCTGCAACCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTC
CGTACGGGCGTGGCGGGGCTCGCCGTGCCCGCGGGGGTGGCGGAGTGGGGGTGCCGGGGGGGG
CGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
AGGCGGGCGAGCCGAGCCATTGCTTTTATGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGACTTCTTTGTCC
CAAACTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGCGCGCGCCACCCCTCTAGCGGGCGGGGGCGAAGCGGT
GCGGCGGGCAGGAAGGAATGGGCGGGGAGGGCTTCGTGCTGCGCGCGCGGGGGGGGGGGGGGGGG
TCTCCAGCCTCGGGGCTGTCGGCGGGGGGACGGCTGCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGGGGGTTCGGC
TTCTGGCGTGTGACCGGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCCTTCTTCTTTTCTCTACAGC
TCCGTGGCAACGTGCTGCTATTGTGCTGCTCATCATTTTGGCAAGAAATG

图4A

(SEQ ID NO:33): EF1 α 启动子

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCCACAGTCCCCGAG AAGTTGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGTCGTGTA CTGGCTCCG
CCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT GAACGTTCTTTTCGCAAC
GGGTTTGGCCGCAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGGGGCTTGGCCTCTTTACGGGTTATG
GCCCTTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG ATCCCGAGCTTCGGGTTGG
AAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGCCTTGAGTTGAGGCCCTGG
CCTGGGCGCTGGGCGCGCGGTGCGAATCTGTTGGCACCTTCGCGCCTGT CTCGCTGCTTTTCGATAAGT
CTCTAGCCATTAAAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTTCTGGC AAGATAGTCTTTGTAAATGC
GGCCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTT TTGGGGCCGCGGGCGGA CGGGGCCCGTGCGTCCAG
CGCACATGTTCCGGCAGCGCGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAA TCGGA CGGGGGTAGTCTCAAGCTG
GCCGGCCTGCTCTGGTGCCCTGGTCTCGCGCGCGCGGTATCGCCCGCCCTT GGGCGGCAAGCTGGCCCG
GTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAAATGGAGG
ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGGGGTGAGTCACCACACAAAGGAAAGGCCCTTCCGTCCTCAGCCG
TCGCTTCA TGTA CTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGCACCTCGATT AGTTCTCGAGCTTTTGGAG
TACGTCGTCCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA CACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAATCTCCTTGGAAATTTGCCCTT TTTGAGTTTGGATCTTGGT
TCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGG TGTCGTGA

图4B

(SEQ ID NO:34): EFS启动子

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCAGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCCG
GCAATTGATCCCGTGCCCTAGAGAAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCG
CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAAC
GGGTTTGCCGCCAGAACACAGG

图4C

(SEQ ID NO:35): rBG poly A信号序列

CCTCAGGTGCAGGCTGCCCTATCAGAAGGTGGTGGCCAAATGCCCTGGCTCACAAATACCACT
GAGATCTTTTCCCTCTGCCCAAAATTAATGGGACATCATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTA
ATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGGAAATTTTGTCTCTCACTCGGAAGGACATAT
GGGAGGGCAAAATCATTTAAACATCAGAAATGAGTATTTGGTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGC
TGGTGGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAACAGCCCCCTGCTGTCCATTC
CTTATTCATAGAAAAAGCCTTGACTTGAGTTAGATTTTATATTTTGTGTTATTTTCT
TTAACATCCCTAAAAATTTTCCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTTCCCTCCTCTGACTACTCCAG
TCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATC

图5A

(SEQ ID NO:36): SV40晚期poly A信号序列
CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACTAGAAATGCAGTGAAAAAATGCTTTAT
TTGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAACCATTAAGCTGCAATAAACCAAGTTAACCAAC
AATTGCATTCAATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTAAAGCAAGTAAAAACCTCT
ACAAATGTGGTA

图5B

(SEQ ID NO:37): BGH poly A信号序列
CTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTT CCTTGACCCCTGGGAAGGTGC
CACGCCCACTGTCCTTTCCTAATAAATGAGGAAATTCATCGCATTCCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
CGGTGGGCTCTATGG

图5C

(SEQ ID NO:39)

GGCTCCGGTGCCTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACACAGTCCCGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCTG
GCAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCGTGTAATGGCTCCG
CCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAAC
GGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTCCGTGTGTGGTTCCCGGGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATG
GCCCTTGGGTGCCCTTGAAATTAATTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGG
AAGTGGGTGGGAGAGTTCCGAGGCTTGGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTGTGAGTTGAGGCTGCG
CCTGGGCGCTGGGCGCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGT
CTCTAGCCATTTAATAATTGTGATGACCTGCTGCGGACGCTTTTTCGTGGCAAGATAGTCTTGTAATGC
GGCCAAAGATCTGCACACTGGTAATTTCGGTTTTGGGGCCGGGGCGGGAAGGGCCCGTGGTCCCGAG
CGCACATGTTCCGCGAGCGGGGCTCGGAGCGCGCCACCGAGAAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTG
GCCGGCCTGCTGCTGGTCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTGGCCCG
GTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGTGCAAGGAGCTCAAAATGGAGG
ACGGGGCGCTCGGGAGAGCGGGGGTGAGTACCCACAAAGGAAAGGCCCTTCCGTCCTCAGCCG
TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTTGGAG
TACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGAGTTTGGATCTTGGT
TCATTCTCAGCCCTCAGACAGTGGTTCAAGTTTCTTCTTCCATTTCAGGTGTCTGACAAAGTTTGTAC
AAAAAGCAGGCTGCCACCATGGAGCTGGGGCTGAGCTGGGTGCTTGGCTTTTACAAGGTGTC
CAGGCTCAGGTGCAGCTGTCGAGAGCGGGGGCGGGCTGGTGCAGGCCGAGGAAGCCTGAGACTGTCTTT
GC GTGGCCAGCGGCAGAACCTTTATCGCTTACGCCCATGGGCTGGTTAGACAGGCCCCAGGAAAGAGCG
GGAGTTGTGGCAGCCATCAAAATTTCCCGCGGCTACCACTACTACGCCGACAGCGTGAAGGCCAGA
TTCACCATTTCTAGAGACAACGCCAAGACAACAGTGTACTCTGAGATGAATCTCTGAAACCTGAGGACA

图7

(SEQ ID NO:39)

CAGCCCTGTATTATTGCGCCGCCGACCGCAGTGCCCACTATGAGGCAGGTGAGGCCCTGTGCTGCCCTA
 TTGGGGACAGGGCACTCAGGTACCGTGAGCAGCGGTGGTGGCGGTTCAGGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT
 GCGGGATCGGGTGGCGGTCTCGCAGGTGAACCTGGAGGAGAGCGCGCGGCTGTGTGCAGGCAGGAG
 GTTCCCTGAGACTGTCTTGTGCGCGCTCAGGTAGAACTATCGACAACTATGCCATGGCCCTGGAGCAGACA
 GGCCCCCGGGAAGACCGGAGTTTGTGGCTACCAATTGACTGGGGCGACGGCGGGCCAGGTATGCAAAAC
 AGCGTGAAAGGCAGATTACCAATTCTAGAGACAACGCCAAGGCCACTATGTATCTGCAGATGAATAATC
 TGGAGCCCGAAGACACCGCCGTGTACAGCTGTGCCATGGCCAGACAGTCCC GGGTGAATCTGGATGTGGC
 CAGGTACGACTACTGGGGACAGGGGACCCAGGTGACCGGTGTCCAGCGGTGGCGGTTCAGGGCGGAGGT
 GGCCTCTGGCGGTGGCGGATCGGGTGGCGTCTCG GAGGCCCGCACCTGTGTGCATGTGGACGCGGCC
 GCGCGCTGTGGCCCTGCGGCGCTTCTGGAGGAGCACAGGCTTCTGCCCCCGCTGCCACACAGCCAGGC
 TGACCAGTACGTCCCTCAGCTGGGACCCAGCAGCTCAACCTCGCCCTATGTGGCGCCCTCCCTACCGCGGC
 ATCAAGCAGGTCCGGACCCACTGGCTGCTGGAGCTTGTACCAAGGGGTCCACTGGACGGGCCCTGA
 GCTACAACTTCACCCACCTGGACGGGTACCTGGACCTTCTCAGGGAGAACAGCTCCTCCAGGGTTGA
 GCTGATGGGCAGCGCCCTCGGGCCACTTCACTGACTTTGAGGACAAGCAGCAGGTGTTGAGTGAAGGAC
 TTGGTCTCCAGCCTGGCCAGGAGATACATCGGTAGTACGGACTGGCGCAT GTTCCAGTGGAACTTCG
 AGACGTGGAATGAGCCAGACCAACGACTTTGACAACGTCTCCATGACCA TGCAGGCTTCCCTGAAC TA
 CTACGATGCCCTGCTCGGAGGGTCTGCGCGCCGACGCCCTGCGGCTGGAGGCCCGCGGACTCC
 TTCCACACCCACCGGATCCCCGCTGAGCTGGGGCTCTCTGCGCCACTGC CACGACGGTACCAACTCT
 TCACTGGGAGGGCGGCTGGCTGACTACATCTCTCCCTCCACAGGAAGGTGCGCGCAGCTCCATCTC

图7续

(SEQ ID NO:39)

CATCCTGGAGCAGGAGAGGTCGTCGCGCAGCAGATCCGGCAGCTCTTCCC CAAGTTGCGGACACCCCC
 ATTTACAACGAGCGGACCCGCTGGTGGCTGCTCCCTGCCACAGCCGTGGAGGGCGGACGTGACCT
 ACGGGCCATGGTGGTGAAGGTCAATCGCGCAGCATCAGAACCTGCTACTGG CCAACACACCTCCGCCCTT
 CCCCTACGCGCTCTGAGCAACGACAATGCCCTTCTGAGCTACCAACCGCA CCCCTTCGCGCAGCGCACG
 CTCACCGCGCTTCAGGTCAACAACAACCGCCCGCCACGTGACGCTG TTGCGCAAGCCGGTGCTCA
 CGGCCATGGGGCTGCTGGCGCTGCTGGA TGAGGAGCAGCTCTGGGCCGAAG TGTGCGAGGCCGGGACCGT
 CCTGGACAGCAACCAACGAGTGGCGTCTCTGGCCAGCGCCACCGCCCA GGGCCCGGCCGACGCCCTGG
 CGGCCCGCGGTGCTGATCTACCGAGCGACACACCGCGCCCAACCCCAAC CGCAGCGTCGCGGTGACCC
 TCGGGCTGCGGGGTGCCCCCGGCCCGGCTGCTACGTACGCGCTACCTGGACAAACGGGCTCTG
 CAGCCCCGACGCGGAGTGCGCGCGCTGGCGCGGCTTCCCAAGGCAGAGCA GTTCCGGCGCATG
 CGCGGCTGAGGACCCGCTGGCGCGCGCCCGCTTACCCGCGCGCGCTGACCC TGAACCCGCTGCGCC
 CCGCGCTGCGGCTGCCGCTTTTGTGCTGGTGACGCTGTTCTGGTCTG GTGCGGCCCGGCGCAGGT
 CACGCGGCTCCGCGCCCTGCCCTGACCCCAAGGCGAGCTGGTCTGGTCTG TCGGATGAACACGTTGGC
 TCCAAGTCCCTGTGGACATACGAGATCCAGTTCTCTCAGGACGGTAAGCGG TACACCCCGGTACGACGA
 AGCCATCGACCTTCAACCTCTTTGTGTTTCAGCCACAGACAGGTGCTGTCT CTGGCTCCTACCGAGTTGG
 AGCCCTGGACTACTGGGCCCGACAGGCCCTTCTCGGACCCCTGTGCCGTA CCTGGAGGTCCCTGTGCCA
 AGAGGGCCCCCATCCCCGGGCAATCCATGAACCCAGCTTTTCTGTACAAAGTGGTGA TCCTCAGGTGCAG
 GCTGCCCTATCAGAAAGGTGGTGGCTGGTGCGCCAAATGCCCTGGCTCACA AAATACCACATCTTTTC
 CCTCTGCCCAAAATATAGGGGACATCATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTT CTGGCTAATAAGGAAAT
 TATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAAATTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAT
 CATTTAAACATCAGAAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCC CATATGCTGGCTGCCATGA
 ACAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAATCAGTATATGAACAGCCCCCTGCTGTC CATTCCTTATTCCTATAG
 AAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTATATATTTTGTGTTGTATAT TTTTCTTTTAAACATCCCTA
 AAATTTCTCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTCTGACTA CTCCCAGTCATAGCTGTCC
 CTCTTCTCTTATGGAGATC

图7续

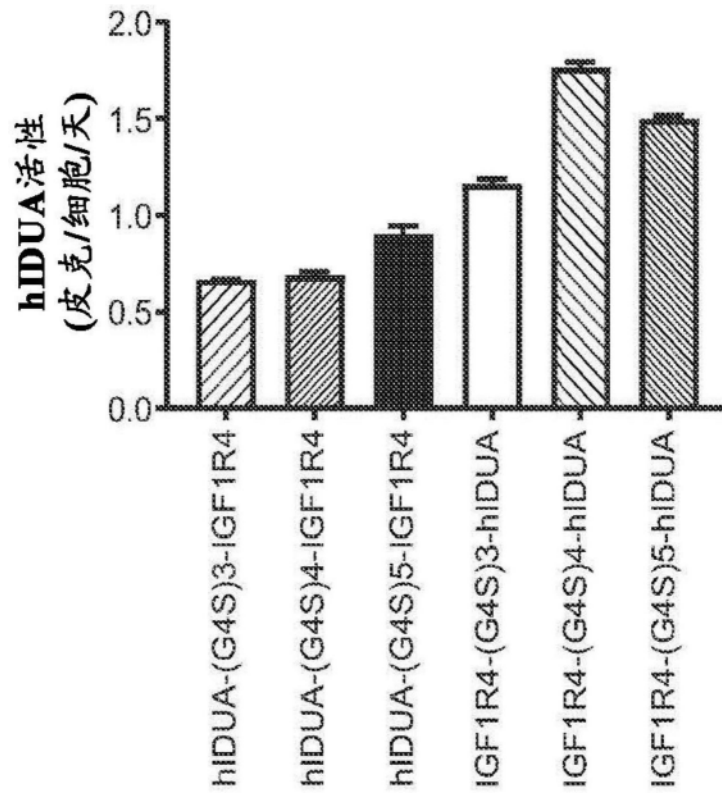


图8A

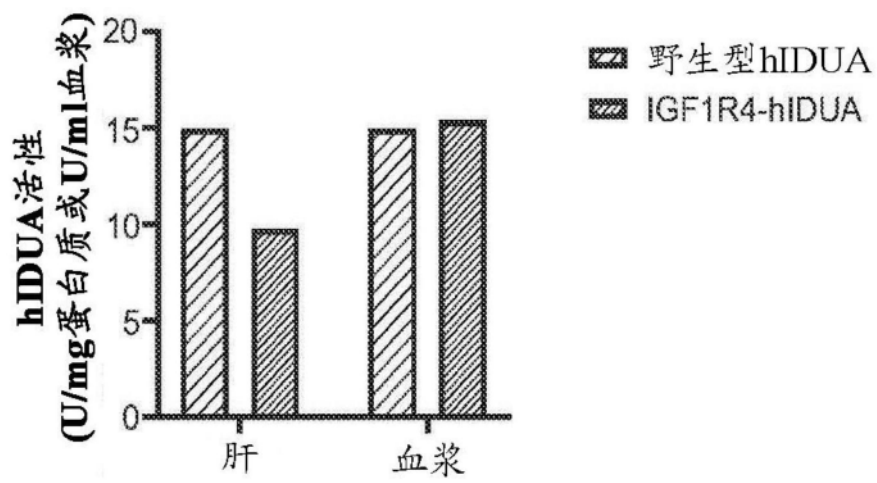


图8B

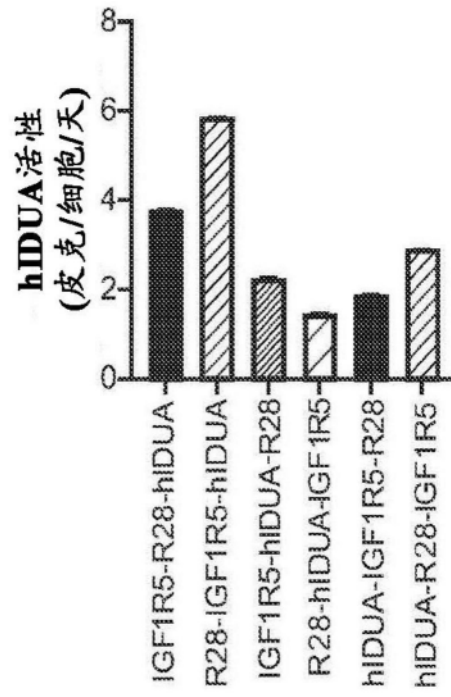


图9A

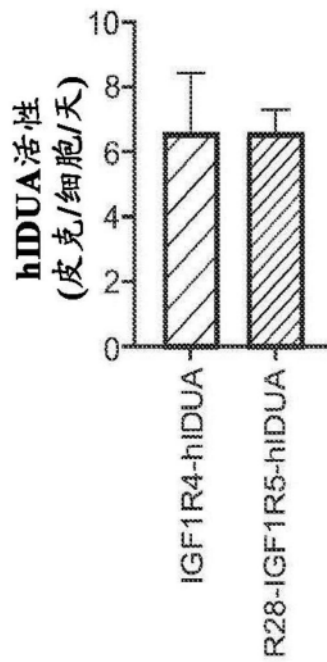


图9B

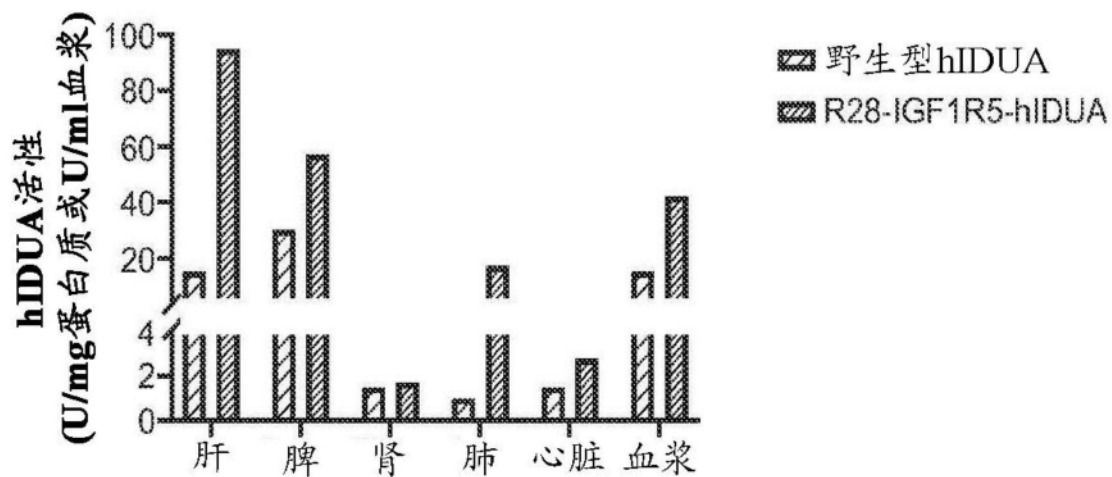


图10

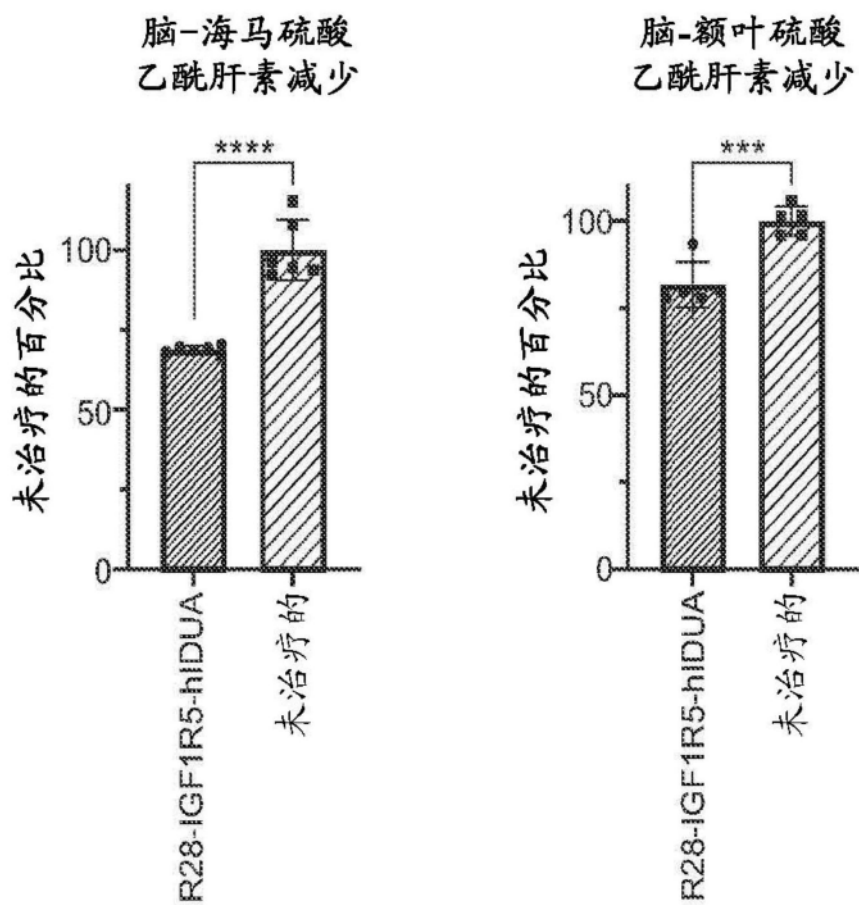


图11

(SEQ ID NO:93)

R28-H5-(GGGGS)m-IGF1R-5-H2-(GGGGS)n-IDS, 其中m和n独立地= 4或5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWERQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFT
 ISRDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQIMRQVRPVLFPYWGQGLTVTVSS (GGGGS)_mQVQLVES
 GGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNSKN
 TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDAVDWGQGLTVTVSS (GGGGS)_nMPPPRTGRGLLWLGVL
 SSVCAALGSETQANSTDAALNVLLIIIVDDLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPS
 RVSF LTGRRPDITRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPP
 YHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQTEQA IQLLEKMKTSASPFFLAVGYHK
 PHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQKIR
 QSYFASVSYLDITQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAEGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFVYPGRT
 ASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPPVPSFHVELCREGKN
 LLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIIDYRYTVWVGFP
 DEFLANFSDIHAGELYFVDSDPDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

图12A

(SEQ ID NO:94)

IGF1R-5-H2-(GGGGS)m-R28-H5-(GGGGS)n-IDS, 其中m和n独立地=4或5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATI DWGDGGTRYANSVKGRFTI
 SRDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMAQRQSRVNLDAFYDWGQGTLVTVSS (GGGGS)_mQVQLVESGGG
 LVQPGGSLRLSCAASGRTFIAYAMGWRQAPGKEREFVAAITNFAGGTTYADSVKGRFTISRDNAKTTV
 YLQMNSLRAEDTAVYYCAADRSAQTMQRQVRPLPYWGQGTLVTVSS (GGGGS)_nMPPPRTGRLGLLWGLVL
 SSVCAVGSETQANSTTDALNVLIIIVDDLRLSLGCGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAAPS
 RVSFITGRRPDTTRLVDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFH PGISSNHTDDSPYSWSFPP
 YHPSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAQLLEKMKTSASPFLLAVGYHK
 PHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQRKIR
 QSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAIGEHWAKY SNFDVATHVPLIFVYPGRRT
 ASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPFSFHVLCREGKN
 LLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSIRTIIDYRYTVWVGFPN
 DEFLANFSDIHAGELYFVDSDDLQDHNMYNDSQGGDLFQLIMP

图12B

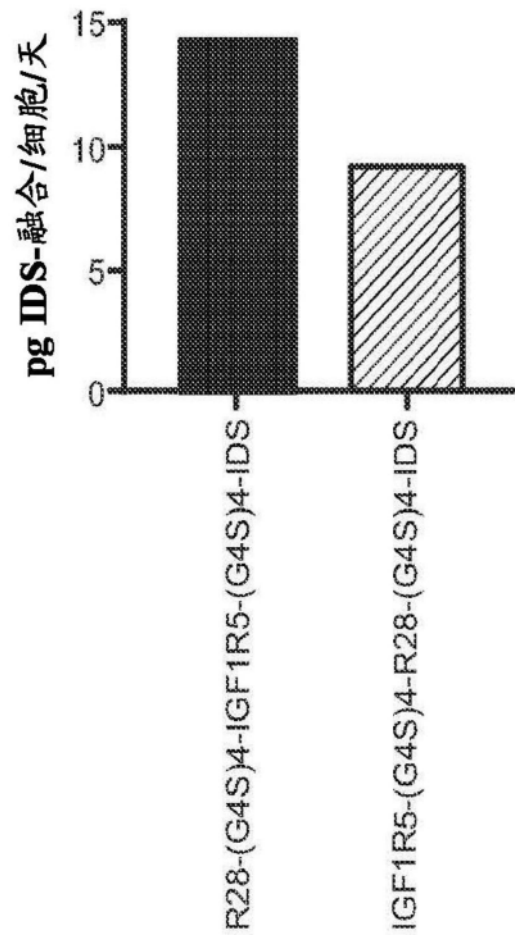


图13

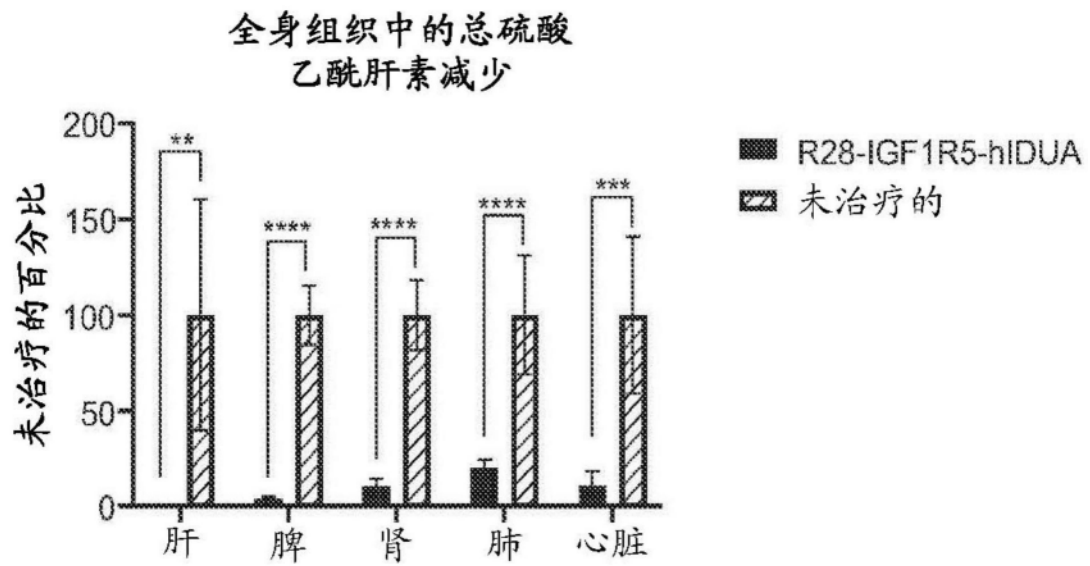


图14

在4周时中脑硫酸乙酰肝素减少

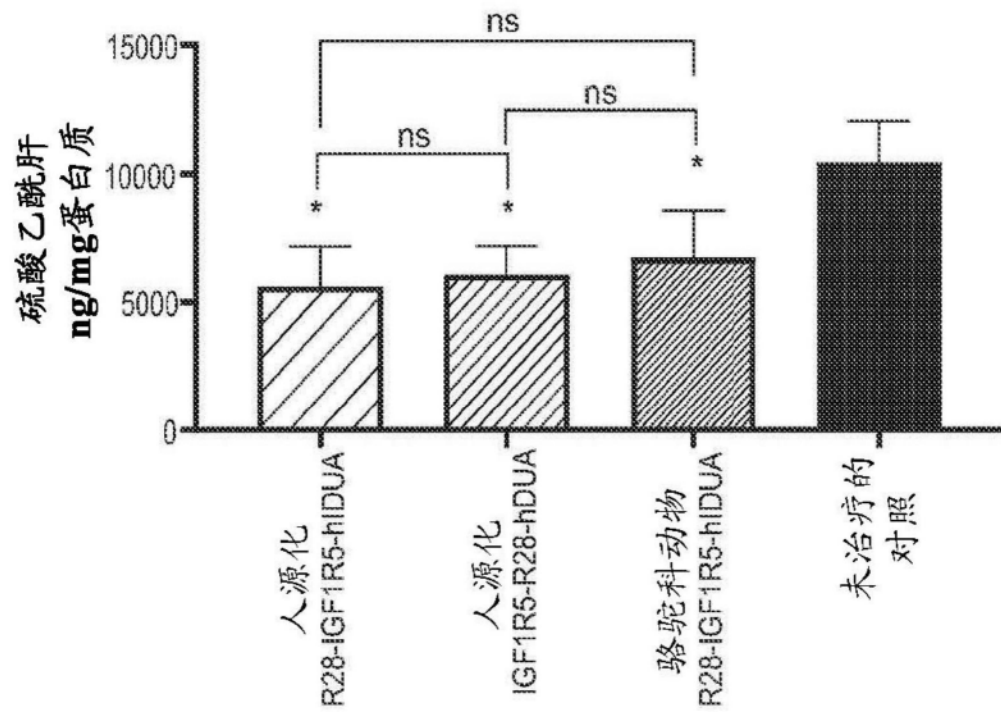


图15