



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116419760 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 11

(21) 申请号 202180075093.2

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2021.11.15

专利代理师 王永伟

(30) 优先权数据

10-2020-0152247 2020.11.13 KR

(51) Int.Cl.

A61K 38/47 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2021/016630 2021.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/103221 KO 2022.05.19

(71) 申请人 韩美药品株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 崔宰赫 金真英 C·R·朴

金尚允 金晶雅 D·S·张

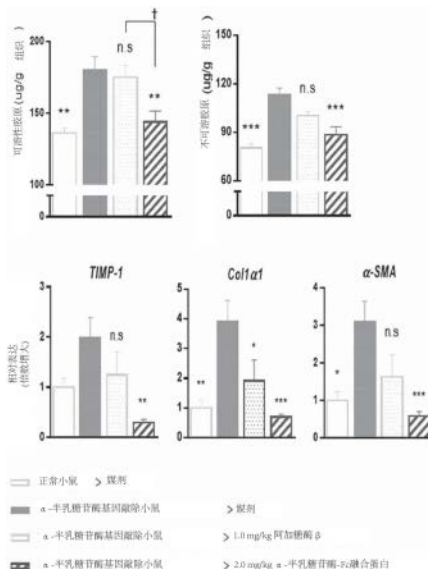
权利要求书2页 说明书25页
序列表14页 附图4页

(54) 发明名称

治疗酶融合蛋白在预防和治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途

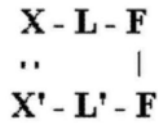
(57) 摘要

本发明涉及治疗酶和免疫球蛋白Fc区的融合蛋白在预防或改善由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途。



1. 用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的药物组合物,所述药物组合物包括由下列化学式1表示的酶融合蛋白:

[化学式1]



其中X和X' 各自是 α -半乳糖苷酶;

L和L' 是连接体,各自独立地是相同或不同种类的连接体;

F是免疫球蛋白Fc区的一条多肽链;

|是共价键;并且

:是共价键或非共价键。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述酶是由X和X' 形成的反向平行二聚体。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区包括具有SEQ ID NO: 31的氨基酸序列的铰链区。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区具有在SEQ ID NO:8的氨基酸序列中脯氨酸对第2位氨基酸的取代;谷氨酰胺对第71位氨基酸的取代;或脯氨酸对第2位氨基酸的取代和谷氨酰胺对第71位氨基酸的取代。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述连接体是由1个氨基酸至100个氨基酸组成的肽连接体。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述肽连接体由 $[\text{GS}]_x$ 、 $[\text{GGGS}]_x$ 或 $[\text{GGGGS}]_x$ 的氨基酸序列组成,其中x是1至20的自然数。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述肽连接体具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述肾病是选自下列的一种或多种:肾炎、肾小球性肾炎、肾病综合征、肾盂肾炎、肾纤维化、慢性肾病、肾衰竭和肾损伤。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述肾纤维化包括肾源性系统性纤维化(NSF)或囊性纤维化。

11. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述药物组合物在施用所述药物组合物的个体中表现出下列特征中的一种或多种:

- (i) 肾组织中lyso-Gb3或Gb3的水平降低;
- (ii) 肾组织中TIMP-1(金属蛋白酶-1的组织抑制剂)的水平降低;
- (iii) 肾组织中1型胶原 $\alpha 1$ 的水平降低;
- (iv) 肾组织中 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的水平降低;和
- (v) 肾组织中可溶性胶原和不溶性胶原的水平降低。

12. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述肾纤维化伴有炎症或由炎症引起。

13. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述药物组合物在施用所述药物组合物的个体中表现出下列特征中的一种或多种:

- (i) 肾组织中TNF- α 的水平降低;

- (ii) 肾组织中IL-6的水平降低;
- (iii) 肾组织中RANTES的水平降低;和
- (iv) 血液中TNFR1的水平降低。

14. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中与所述酶融合蛋白以外的酶相比,所述融合蛋白对肾的组织靶向性增加。

15. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中与所述酶融合蛋白以外的酶相比,所述融合蛋白向有需要的个体的施用频率降低。

16. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述药物组合物向个体每两周施用一次或每月施用一次。

17. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述酶融合蛋白包括包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的单体。

18. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中X和X' 是酶,各自包含彼此相同或不同的氨基酸序列。

治疗酶融合蛋白在预防和治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包括治疗酶的酶融合蛋白在预防和治疗由法布里病 (Fabry disease) 引起或伴有法布里病的肾病中的用途。

背景技术

[0002] 溶酶体贮积症 (Lysosomal Storage Disorders, LSD) 是一种因溶酶体功能丧失而发生的遗传性代谢障碍。LSD是由降解脂质、蛋白质、多糖等物质的酶的不足引起的,并且它们的发生率通常为十万分之一且作为隐性性状遗传。当具备这种降解作用的特定酶不足或其量非常少时,就会发生LSD,而当这种降解酶不足时,过量的物质会累积而不被降解,最终引起细胞功能问题。

[0003] 法布里病被称为LSD之一,是一种先天性代谢障碍,其发生是由于溶酶体中存在的水解酶 α -半乳糖苷酶的酶活性的不足或缺乏。法布里病是以与性染色体相关的隐性形式遗传的,并且已知 α -半乳糖苷酶的缺陷会导致血管壁和身体各种部分(例如,皮肤、肾、心脏、神经系统等)中Gb3(神经酰胺三己糖苷(globotriaosylceramide))和lyso-Gb3(脱乙酰基的神经酰胺三己糖苷)的异常累积,从而影响血液循环和营养供应的减少。可能发生感觉异常(parathesia)、剧痛、血管角质瘤、心脏缺血、心肌梗死、肾衰竭等症状,从而导致肾衰竭,并最终导致死亡。

[0004] α -半乳糖苷酶是一种将Gb3(神经酰胺三己糖苷)和lyso-Gb3分解为乳糖酶基鞘氨醇的酶。已知这种酶的异常会导致Gb3和lyso-Gb3在血管壁和身体各种部分的异常累积,从而导致法布里病。

[0005] 作为一种治疗包括法布里病在内的LSD的方法,主要研究了酶替代疗法(ERT)(Frances M.Platt et al., J Cell Biol.2012 Nov 26;199(5):723-34)。具体地,由于法布里病是一种由 α -半乳糖苷酶的缺陷引起的疾病,因此用 α -半乳糖苷酶的补充治疗是必不可少的。

[0006] 然而,表现出这种治疗效果的蛋白质通常由于其低稳定性而容易变性,并且被血液中的蛋白水解酶降解,因此,必须经常向患者施用它们以维持其血液水平和活性。然而,频繁注射维持血液水平会给患者带来巨大痛苦。为了解决这些问题,有必要提高酶替代疗法中使用的治疗剂的血液稳定性并开发出一种在长时间维持高药物血液水平的同时维持蛋白质活性的治疗剂。

[0007] 同时,法布里病由于Gb3和lyso-Gb3在包括肾在内的器官中的累积而导致器官损伤。具体地,由于Gb3和lyso-Gb3的累积,肾会经历炎性反应,并进一步纤维化,从而导致慢性肾病和肾衰竭,最终导致患者死亡。为了预防法布里病进一步的进展以及为了对其有效治疗,重要的是在早期抑制和改善肾的炎性反应和纤维化。然而,对能够抑制和改善肾的炎性反应和纤维化的治疗剂——作为酶替代疗法中使用的治疗剂——的开发是不足的。

[0008] 因此,开发治疗剂的重要性正在显现,该治疗剂通过抑制和改善肾的炎症和纤维

化,同时在体内具有长持续时间而对肾病有效。

发明内容

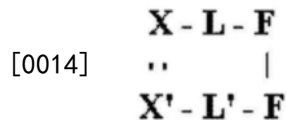
[0009] **【技术问题】**

[0010] 存在对开发出通过抑制和改善肾的炎症和纤维化而对肾病有效的治疗剂的需求。

[0011] **【技术方案】**

[0012] 本发明的目的是提供用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的药物组合物,所述药物组合物包括由下列化学式1表示的酶融合蛋白:

[0013] [化学式1]



[0015] 其中X和X' 各自是 α -半乳糖苷酶;

[0016] L和L' 是连接体,各自独立地是相同或不同种类的连接体;

[0017] F是免疫球蛋白Fc区的一条多肽链;

[0018] |是共价键;并且

[0019] :是共价键或非共价键。

[0020] 本发明的另一个目的是提供预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用所述酶融合蛋白或包括其的组合物的步骤。

[0021] 本发明的又一个目的是提供所述酶融合蛋白或包括其的组合物在预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途。

[0022] **【有利效果】**

[0023] 本发明涉及包括治疗酶的融合蛋白在预防或改善由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途。由于持续时间的增加,所述酶融合蛋白可以有用地应用于患者,也可以有效地用于治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病。

附图说明

[0024] 图1显示了比较 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)和阿加糖酶 β (agalsidase beta)的组织分布的结果;

[0025] 图2显示了比较通过 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)和阿加糖酶 β 降低的lyso-Gb3水平的结果;

[0026] 图3显示了比较通过 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)和阿加糖酶 β 改善炎症的效果的结果;以及

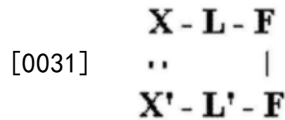
[0027] 图4显示了比较通过 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)和阿加糖酶 β 改善纤维化的效果的结果。

具体实施方式

[0028] 本发明的一个方面提供了用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的药物组合物,所述药物组合物包括治疗酶和免疫球蛋白Fc区融合的酶融合蛋白。

[0029] 根据一个具体实施方式的药物组合物,其特征在于所述酶融合蛋白是由下列化学式1表示的酶融合蛋白:

[0030] [化学式1]



[0032] 其中X和X'各自是 α -半乳糖苷酶;

[0033] L和L'是连接体,各自独立地是相同或不同种类的连接体;

[0034] F是免疫球蛋白Fc区的一条多肽链;

[0035] |是共价键;并且

[0036] ..:是共价键或非共价键。

[0037] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述酶是由X和X'形成的反向平行(anti-parallel)二聚体。

[0038] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的(aglycosylated)。

[0039] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区包括具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的铰链区。

[0040] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区衍生自IgG、IgA、IgD、IgE或IgM。

[0041] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区衍生自IgG Fc区。

[0042] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区衍生自IgG4 Fc区。

[0043] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区衍生自非糖基化Fc区,所述非糖基化Fc区衍生自人IgG4。

[0044] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区选自(a)CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域;(b)CH1结构域和CH2结构域;(c)CH1结构域和CH3结构域;(d)CH2结构域和CH3结构域;和(e)CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域中的一个结构域或者两个或更多个结构域与免疫球蛋白铰链区或所述铰链区的部分的组合。

[0045] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区具有在具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的免疫球蛋白Fc区中脯氨酸对第2位氨基酸的取代;谷氨酰胺对第71位氨基酸的取代;或脯氨酸对第2位氨基酸的取代和谷氨酰胺对第71位氨基酸的取代。

[0046] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述免疫球蛋白Fc区包括具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的单体。

[0047] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述连接体由1个氨基酸至100个氨基酸组成。

[0048] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述肽连接体由[GS]

x、[GGGS]_x或[GGGGS]_x的氨基酸序列组成,其中x是1至20的自然数。

[0049] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述肽连接体具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0050] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述肾病是选自下列的至少一种:肾炎、肾小球性肾炎、肾病综合征、肾盂肾炎、肾纤维化、慢性肾病、肾衰竭和肾损伤(renal impairment)。

[0051] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述肾纤维化包括肾源性系统性纤维化(nephrogenic systemic fibrosis,NSF)或囊性纤维化。

[0052] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述药物组合物在施用所述药物组合物的个体中表现出下列特征中的一种或多种:

[0053] (i) 肾组织中lyso-Gb3或Gb3的水平降低;

[0054] (ii) 肾组织中TIMP-1(金属蛋白酶-1的组织抑制剂)的水平降低;

[0055] (iii) 肾组织中1型胶原 α 1(collagen type1 α 1)的水平降低;

[0056] (iv) 肾组织中 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的水平降低;和

[0057] (v) 肾组织中可溶性胶原和不溶性胶原的水平降低。

[0058] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述肾纤维化伴有炎症或由炎症引起。

[0059] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述药物组合物在施用所述药物组合物的个体中表现出下列特征中的一种或多种:

[0060] (i) 肾组织中TNF- α 的水平降低;

[0061] (ii) 肾组织中IL-6的水平降低;

[0062] (iii) 肾组织中RANTES的水平降低;和

[0063] (iv) 血液中TNFR1的水平降低。

[0064] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于与所述酶融合蛋白以外的酶相比,所述融合蛋白对肾的组织靶向性增加。

[0065] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于与所述酶融合蛋白以外的酶相比,所述融合蛋白向有需要的个体的施用频率降低。

[0066] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述药物组合物向个体每两周施用一次或每月施用一次。

[0067] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述酶融合蛋白包括包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的单体。

[0068] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于所述酶融合蛋白是由单体形成的二聚体,在所述单体中一分子所述 α -半乳糖苷酶和一分子所述免疫球蛋白Fc区经由肽连接体连接。

[0069] 根据上述具体实施方式中任一项的药物组合物的特征在于X和X' 是酶,各自包含彼此相同或不同的氨基酸序列。

[0070] 本发明的另一方面提供了预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用所述酶融合蛋白或包括其的组合物的步骤。

[0071] 本发明的又一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在制备用于由法布

里病引起或伴有法布里病的肾病的预防剂或治疗剂中的用途。

[0072] 本发明的又一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途。

[0073] 实施本发明的方式

[0074] 下面将详细描述本发明。同时,本公开所公开的各个描述和实施方式都可适用于其它描述和实施方式。即,本公开所公开的各种要素的所有组合都落入本发明的范围内。此外,本发明的范围不受下文具体描述的限制。

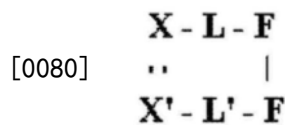
[0075] 此外,本领域技术人员将认识到,或者仅用常规实验就能确定本文所述的本公开具体实施方式的多种等价物。此外,这些等价物应被理解为落入本发明范围内。

[0076] 在整个说明书中,不仅对天然存在的氨基酸使用常规的单字母和三字母代码,而且使用通常允许用于其它氨基酸的三字母代码,如Aib(2-氨基异丁酸)、Sar(N-甲基甘氨酸)等。另外,本文中以缩写方式提到的氨基酸按照IUPAC-IUB规则来描述。

	丙氨酸 A	精氨酸 R
	天冬酰胺 N	天冬氨酸 D
	半胱氨酸 C	谷氨酸 E
	谷氨酰胺 Q	甘氨酸 G
[0077]	组氨酸 H	异亮氨酸 I
	亮氨酸 L	赖氨酸 K
	甲硫氨酸 M	苯丙氨酸 F
	脯氨酸 P	丝氨酸 S
	苏氨酸 T	色氨酸 W
	酪氨酸 Y	缬氨酸 V

[0078] 本发明的一个方面提供了用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的药物组合物,所述药物组合物包括由下列化学式1表示的酶融合蛋白:

[0079] [化学式1]



[0081] 其中X和X'各自是 α -半乳糖苷酶;

[0082] L和L'是连接体,各自独立地是相同或不同种类的连接体;

[0083] F是免疫球蛋白Fc区的一条多肽链;

[0084] |是共价键;并且

[0085] :是共价键或非共价键。

[0086] 在一个实施方式中,所述药物组合物可以是包括药学上可接受的媒剂(vehicle)和药学有效量的由化学式1表示的酶融合蛋白的药物组合物。如本文所用,“药学有效量”是指酶融合蛋白的安全剂量,其对患者不表现出毒性或副作用,同时对由法布里病引起或伴有法布里病的肾病表现出预防或治疗效果,但不限于此。

[0087] 如本文所用,术语“酶融合蛋白”是这样的蛋白:其中免疫球蛋白Fc区与治疗酶融

合使得治疗酶与未融合免疫球蛋白Fc区的治疗酶相比可维持其活性,同时其对溶酶体受体的结合亲和力降低,从而增加其血液半衰期。本发明的酶融合蛋白可用作酶替代疗法(ERT)的药物。酶替代疗法可通过补充引起疾病的缺陷的酶或不足的酶来恢复劣化的酶功能来预防或治疗该疾病。

[0088] 本发明人制备了具有免疫球蛋白Fc区的融合蛋白以增加治疗酶的血液半衰期。本发明的酶融合蛋白中包括的Fc区可以是IgG4 Fc区,其中潜在的糖基化序列经取代以抑制糖基化,并且另外,IgG4 Fc的铰链序列经取代以抑制链交换,但不限于此。

[0089] 在化学式1中,作为免疫球蛋白Fc区(例如,铰链序列经取代的IgG4 Fc区)的F可通过连接体与治疗酶连接形成单体,并且该单体可与包括其它免疫球蛋白Fc区和治疗酶的单体一起形成二聚体。关于该二聚体,该二聚体可通过免疫球蛋白Fc区之间的共价键以及通过治疗酶之间的共价键或非共价键形成,但不限于此。具体地,已证实当待与免疫球蛋白Fc区融合的治疗酶形成二聚体,特别是反向平行二聚体时,体内持续时间得以增加,同时维持酶促活性。因此,与未融合Fc区的治疗酶相比,本发明的酶融合蛋白具有提高稳定性的优点。

[0090] 如本文所用,术语“治疗酶”是指用于治疗由于酶的缺乏、不足、功能障碍等而发生的疾病的酶,并且是指能够通过酶替代疗法、施用等治疗患有该疾病的个体的酶。可包括在本发明的酶融合蛋白中的治疗酶没有特别限制,并且任何治疗酶都可包括在本发明的酶融合蛋白中,只要它是能够通过比未融合形式的治疗酶更长的体内持续时间获得优点的治疗酶即可。在本发明的一个实施方式中,酶融合蛋白是治疗酶的融合蛋白。

[0091] 在本发明中,治疗酶可以是 α -半乳糖苷酶。

[0092] 包括在本发明的酶融合蛋白中的治疗酶可经由非共价键形成二聚体,但不限于此。具体地,当融合蛋白在转化体中表达并且免疫球蛋白Fc区形成二聚体时,治疗酶也可形成二聚体。

[0093] 治疗酶的这种二聚体可以由彼此相同的两种酶形成的二聚体,也可以是由两种彼此不同的酶形成的二聚体。只要这些酶在体内具有期望的活性,那么构成二聚体的酶的具体种类就不受限制。

[0094] 同时,根据它们连接的方向,构成二聚体的这些治疗酶可以是平行二聚体或反向平行二聚体的形式,但不限于此。就具体示例而言,对于化学式1中的酶,X和X'可形成反向平行二聚体,但不限于此。

[0095] 在本发明的一个示例性实施方式中,制备了这样的融合蛋白,其中作为治疗酶的 α -半乳糖苷酶与免疫球蛋白Fc区融合,并且证实了 α -半乳糖苷酶通过非共价键形成反向平行二聚体,而融合蛋白的免疫球蛋白Fc区形成二聚体(实施例1)。

[0096] 如本文所用,术语“平行二聚体”是指当各单体形成二聚体时,各单体的氨基酸序列的N-末端和C-末端沿相同方向形成二聚体。在这点上,二聚体可通过非共价键或共价键形成,但不限于此。

[0097] 如本文所用,术语“反向平行二聚体”是指当各单体形成二聚体时,各单体的氨基酸序列的N-末端和C-末端沿彼此不同的方向形成二聚体。在这点上,二聚体可通过非共价键或共价键形成,但不限于此。

[0098] 换言之,在本发明的酶融合蛋白中,有可能(i)一种治疗酶(X)的N-末端和另一种

治疗酶(X')的N-末端可沿相同方向形成二聚体,(ii)一种治疗酶(X)的C-末端和另一种治疗酶(X')的C-末端可沿相同方向形成二聚体,(iii)一种治疗酶(X)的N-末端和另一种治疗酶(X')的C-末端可沿相同方向形成二聚体,或(iv)一种治疗酶(X)的C-末端和另一种治疗酶(X')的N-末端可沿相同方向形成二聚体。情况(i)和(ii)中的二聚体被称为平行二聚体,而情况(iii)和(iv)中的二聚体被称为反向平行二聚体。这些二聚体的形成可通过共价键或非共价键发生,但不限于此。

[0099] 具体地,在上述二聚体的形成中,平行二聚体或反向平行二聚体的形成可以是这样的:随着免疫球蛋白Fc区形成二聚体,与其连接的单体的 α -半乳糖苷酶通过共价键或非共价键形成二聚体。

[0100] 包括在本发明的酶融合蛋白中的酶可以是 α -半乳糖苷酶。关于本发明的目的,酶融合蛋白可包括二聚体治疗酶,具体地,由 α -半乳糖苷酶形成的二聚体或由 α -半乳糖苷酶和另一种治疗酶形成的二聚体,但不限于此。本发明的融合蛋白的示例可包括这样的融合蛋白,其中在化学式1中,X和X'可以是 α -半乳糖苷酶,且X和X'的氨基酸序列可彼此相同或不同。例如,X和X'都可以是天然 α -半乳糖苷酶,或者X和X'中的任一个可以是天然 α -半乳糖苷酶,而另一个可以是天然 α -半乳糖苷酶的部分序列被修饰的变体,但不限于此。可选地,X和X'可以是具有彼此不同的序列的 α -半乳糖苷酶的变体,但不限于此。

[0101] 如本文所用,术语“ α -半乳糖苷酶(α -GAL)或 α -半乳糖苷酶A(α -GAL A)”是存在于脾、脑、肝等的溶酶体中的酶,其水解糖脂和糖蛋白中的末端 α -半乳糖基部分,并且是同型二聚的糖蛋白。具体地,已知 α -半乳糖苷酶A水解神经酰胺三己糖苷并且催化蜜二糖水解成半乳糖和葡萄糖,并且特别是已知其与法布里病——一种溶酶体贮积病——相关。由于作为法布里病病因的 α -半乳糖苷酶的缺陷和不足可用使用本发明的酶融合蛋白的酶替代疗法(ERT)来补充,因此酶融合蛋白可对由法布里病引起或伴有法布里病的各种肾病表现出治疗效果。

[0102] 在本发明中, α -半乳糖苷酶可包括重组形式的和阿加糖酶 α 或和阿加糖酶 β ,并且任何酶都可包括在本发明的范围内,而对其序列、来源、制备方法等没有限制,只要该酶是表现出与其相当的活性和治疗效果的酶即可。具体地, α -半乳糖苷酶可由SEQ ID NO:5的多核苷酸序列编码,并且可包括或可(主要)由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成,但不限于此。可选地,本发明的 α -半乳糖苷酶可包括与天然 α -半乳糖苷酶或SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有60%、70%、80%或更高,90%或更高,更具体地91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的同源性的氨基酸序列,但不限于此。

[0103] 虽然在本发明中将其描述为“由特定序列号组成”的肽,但只要肽具有与由相应序列号的氨基酸序列组成的肽相同或等同的活性即可,显然并不排除在相应序列号的氨基酸序列之前或之后添加无意义的序列、天然存在的突变或其沉默突变,并且序列添加或突变是包括在本发明的范围内的。换言之,虽然在一些序列中存在差异,但只要其在预定水平或更高水平上表现出同源性并且表现出与天然 α -半乳糖苷酶等同或相似的活性,其也可落入本发明的范围内。

[0104] 如本文所用,术语“同源性”或“同一性”是指两个给定氨基酸序列或核苷酸序列之间的相关度,并且可表示为百分比。

[0105] 术语“同源性”和“同一性”通常可彼此互换使用。

[0106] 任意两个肽序列之间的同源性、相似性或同一性都可使用已知的计算机算法诸如,例如利用默认参数的“FASTA”程序确定,如Pearson et al (1988) [Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]:2444中那样。可选地,它可使用下列确定:Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)——其在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件(European Molecular Biology Open Software Suite),Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)(5.0.0版本或更高版本)的Needleman程序中执行(包括GCG程序包((Devereux,J.,et al,Nucleic Acids Research 12:387(1984)),BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul,[S.][F.,][ET AL,J MOLEC BIOL 215]:403(1990);Guide to Huge Computers,Martin J.Bishop,[ED.,]Academic Press,San Diego,1994,和[CARILLO ETA/.](1988)SIAM J Applied Math 48:1073)。例如,可利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的BLAST或ClustalW来确定同源性、相似性或同一性。

[0107] 肽的同源性、相似性或同一性可通过利用例如GAP计算机程序——例如,得知于例如Smith和Waterman,Adv.Appl.Math(1981)2:482——比较序列信息来确定。总之,GAP程序可被定义为通过相似经比对符号(即氨基酸)的数量除以两个序列中较短者的符号总数而获得的值。GAP程序的默认参数可包括(1)一元比较矩阵(包含同一性值1和非同一性值0)和Schwartz与Dayhoff,eds.,Atlas Of Protein Sequence And Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)公开的Gribskov et al.(1986)Nucl.Acids Res.14:6745的加权比较矩阵(或EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)替换矩阵);(2)每个空位3.0的罚分和每个空位中每个符号另外0.10的罚分(或10的空位开放罚分,0.5的空位扩展罚分);和(3)末端空位无罚分。因此,如本文所用,术语“同源性”或“同一性”是指序列之间的相关性。

[0108] 关于治疗酶或其衍生物的序列和编码其的核苷酸序列的信息可从已知的数据库例如NCBI等获得。

[0109] 本发明的治疗酶可以是天然酶,并且由天然酶的部分组成的片段或发生了选自某些氨基酸的取代、添加、缺失和修饰及其组合的变异的治疗酶的类似物可以非限制地包括在本发明中,只要其具有与天然治疗酶等同的活性即可。

[0110] 如本文所用,术语“片段”是指移除天然治疗酶或天然治疗酶的类似物的氨基末端或羧基末端的一个或多个氨基酸的形式。不管片段的大小或氨基酸的种类如何,只要它们具有治疗酶的活性,那么任何酶都属于本发明的范围。

[0111] 此外,治疗酶的类似物包括一个或多个氨基酸添加到天然治疗酶的氨基末端和/或羧基末端的所有那些类似物。

[0112] 此外,治疗酶的类似物可以是天然治疗酶序列中的一个或多个氨基酸残基被取代或添加的那些类似物。作为待取代或添加的氨基酸,不仅可以用于人类蛋白质中的20种氨基酸,也可以使用非典型氨基酸或非天然存在的氨基酸。非典型氨基酸的商业来源可包括Sigma-Aldrich、ChemPep Inc.和Genzyme Pharmaceuticals。包含这些氨基酸的肽以及非典型肽序列可被合成以及从商业肽供应商(例如,American Peptide Company(USA)或Anygen(韩国))购买,但不特别限于此。

[0113] 治疗酶类似物可包括相应治疗酶的生物仿制药(biosimilars)和生物改良药

(biobetters)。例如,关于生物仿制药,考虑到表达其的宿主与已知治疗酶的差异,糖基化特征及其程度的差异,以及按照标准序列——其中取代程度不是100%取代——相应酶的特定氨基酸残基中的取代程度的差异,它们属于被用作本发明的酶融合蛋白的生物仿制药。治疗酶可通过本领域已知的方法,具体地通过遗传重组在动物细胞、大肠杆菌(E.coli)、酵母、昆虫细胞、植物细胞、活体动物等中制备或生产,并且生产方法不限于此,并且可购买和使用商业上可获得的治疗酶,但不限于此。

[0114] 治疗酶可通过本领域已知的方法制备或生产,具体地,酶可在培养插入了动物表达载体的动物细胞后从培养物中纯化,也可在购买商业上可获得的酶之后使用,但不限于此。

[0115] 本发明的酶融合蛋白可以是治疗酶和免疫球蛋白Fc区经由肽连接体融合的酶融合蛋白。换言之,化学式1中的L或L'可以是肽连接体,但没有特别限制,只要它能够将免疫球蛋白Fc区与治疗酶融合即可。

[0116] 肽连接体可包括一个或多个氨基酸,例如,1个氨基酸至1000个氨基酸,1个氨基酸至500个氨基酸,1个氨基酸至100个氨基酸,或1个氨基酸至50个氨基酸,以及本领域已知的任何肽连接体,例如,包括[GS]_x连接体、[GGGS]_x连接体和[GGGG]_x连接体等,其中x是1或更大的自然数(例如,1、2、3、4、5或更大),并且对于具体示例而言,x可以是1至20的自然数,但不限于此。具体地,本发明的肽连接体可由10至50个氨基酸序列组成,更具体地,由20至40个氨基酸序列组成,并且可由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

[0117] 关于本发明的目的,肽连接体与治疗酶和免疫球蛋白Fc融合的位置不受限制,只要肽连接体能够连接治疗酶和免疫球蛋白Fc,同时维持治疗酶的活性即可。具体地,该位置可以是治疗酶和免疫球蛋白Fc区的两端,并且更具体地,该位置可以是治疗酶的C-末端和免疫球蛋白Fc区的N-末端,但不限于此。

[0118] 如本文所用,术语“N-末端”和“C-末端”分别指蛋白质的氨基端和羧基端。例如,N-末端或C-末端可以包括,但不限于,不仅仅是N-末端或C-末端的最末端氨基酸残基,还可以是N-末端或C-末端附近的氨基酸残基,并且具体地,是从该最末端起第1个氨基酸残基至第20个氨基酸残基。

[0119] 在本发明的一个示例性实施方式中,通过合成使得作为治疗酶的 α -半乳糖苷酶和连接体-IgG4在基因水平上融合来制备融合蛋白(SEQ ID NO:13),其中IgG4 Fc区的N-末端与治疗酶的C-末端融合,并且证实了该融合蛋白在转化了该融合蛋白的转化体中表达(实施例1)。

[0120] 就一个具体示例而言,本发明的酶融合蛋白可包括通过经由肽连接体,通过共价键将 α -半乳糖苷酶连接到免疫球蛋白Fc区而形成的单体,其中二聚体可通过免疫球蛋白Fc区之间的共价键以及通过这两个单体中的治疗酶之间的共价键或非共价键形成,但不限于此。

[0121] 就另一个具体示例而言,本发明的酶融合蛋白可包括包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或(主要)由其组成的单体,或者可具有由该单体形成的二聚体结构,但不限于此。

[0122] 在本发明中,肽连接体可分别连接到由单体免疫球蛋白Fc区形成的二聚体免疫球蛋白Fc区,其中连接到各自免疫球蛋白Fc区的连接体彼此可以相同,也可以不同。

[0123] 如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc区”是指免疫球蛋白的包括重链恒定区2(CH2)

和/或重链恒定区3(CH3),不包括重链和轻链可变区的区域。关于本发明的目的,这样的Fc区可包括经修饰的铰链区,但不限于此。具体地,免疫球蛋白Fc区可在天然免疫球蛋白Fc区的至少一个氨基酸中具有选自取代、添加、缺失、修饰及其组合的变异,但不限于此。

[0124] 此外,在本发明中,化学式1的酶融合蛋白中的F可以是衍生自IgG的免疫球蛋白Fc区,具体是IgG4 Fc区,并且可以是非糖基化的,但不限于此。此外,F可以通过取代人IgG4 Fc区中的一个或多个氨基酸而获得的免疫球蛋白Fc区,但不限于此。

[0125] 在化学式1的酶融合蛋白中,F可以是免疫球蛋白Fc区的一条多肽链,但不限于此。

[0126] 化学式1的F的具体示例可包括这样的单体:其中在具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的免疫球蛋白Fc区中脯氨酸取代了第2位氨基酸;谷氨酰胺取代了第71位氨基酸;或脯氨酸取代了第2位氨基酸并且谷氨酰胺取代了第71位氨基酸,但不限于此。

[0127] 免疫球蛋白Fc区是在制药时用作载剂的物质,并且为了稳定蛋白和防止其从肾去除,近来正积极进行利用免疫球蛋白Fc区的融合蛋白研究。免疫球蛋白是血液的主要成分,并且有五种不同的类型如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。融合蛋白研究最常用的类型是IgG,而它分为四个亚型,IgG1~4。利用免疫球蛋白Fc制备的融合蛋白可增加蛋白的大小,从而防止它们在肾中去除,并且还可与FcRn受体结合,从而通过内吞作用和再循环到细胞中而具有增加血液半衰期的作用。

[0128] 在本发明中,Fc区是指由木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白获得的天然序列以及其衍生物,例如,序列因天然序列中一个或多个氨基酸残基的缺失、插入、非保守或保守取代或其组合而不同于天然形式的变体,条件是这些衍生物、取代物和变体保留结合FcRn的能力。在本发明中,F可以是人免疫球蛋白区域,但不限于此。

[0129] 在根据本发明的化学式1的酶融合蛋白中,F是包括一条多肽链的单体免疫球蛋白Fc区,其中该多肽链由于二硫键而形成两条多肽链的二聚体,因此本发明的酶融合蛋白可具有包括二聚体免疫球蛋白Fc区的结构。具体地,酶融合蛋白可具有链仅通过两条链中的一条链的氮原子连接的结构,但不限于此。通过氮原子的键合可以通过还原胺化在赖氨酸ε-氨基原子或N-末端氨基上的键合。

[0130] 还原胺化反应是指这样的反应:其中一个反应物的胺基或氨基与另一反应物的醛基(即能够还原胺化的官能团)反应生成胺,然后通过还原反应形成胺键,而还原胺化反应是本领域公知的有机合成反应。

[0131] 在一个具体示例中,免疫球蛋白Fc区可经由N-末端脯氨酸的氮原子彼此连接,但不限于此。

[0132] 此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是扩展的Fc区,包括免疫球蛋白的全部或部分重链恒定区1(CH1)和/或轻链恒定区1(CL1),不包括重链和轻链可变区,只要免疫球蛋白Fc区具有与其天然型基本上等同或更有改善的效果即可。此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是与CH2和/或CH3相对应的显著长的氨基酸序列的部分被移除的区域。

[0133] 本发明的免疫球蛋白Fc区可以是1) CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域,2) CH1结构域和CH2结构域,3) CH1结构域和CH3结构域,4) CH2结构域和CH3结构域,和(5) CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域中的一个或者两个或更多个结构域与免疫球蛋白铰链区(或铰链区的部分)的组合,但不限于此。更具体地,免疫球蛋白Fc区可由铰链区、CH2结构域和CH3结构域组成,但不限于此。

[0134] 在本发明中,化学式1的F(免疫球蛋白Fc区)可以是单体的形式,但不限于此。具体地,免疫球蛋白Fc区可包括由相同来源的结构域组成的单链免疫球蛋白,但不限于此。

[0135] 在本发明中,化学式1中表示为F的免疫球蛋白Fc区可以是单体的形式,并且可通过肽连接体与单体治疗酶融合来表达。由于单体免疫球蛋白Fc区形成二聚体,因此与免疫球蛋白Fc区融合的治疗酶也可通过非共价键形成二聚体,但不限于此。

[0136] 这种免疫球蛋白Fc区可包括重链恒定区中的铰链区,并且单体免疫球蛋白Fc区可因铰链区而形成二聚体,但不限于此。

[0137] 如本文所用,术语“铰链序列”是指位于重链且经由间二硫键(inter disulfide bond)形成免疫球蛋白Fc区的二聚体的位点。

[0138] 就一个示例而言,铰链序列可以是这样的铰链序列:其中铰链序列的具有下列氨基酸序列的部分被缺失或修饰。

[0139] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:14)

[0140] 具体地,铰链区可以是具有变异的铰链区,其中铰链区的部分被缺失而仅包括一个半胱氨酸(Cys)残基;也可以是参与链交换的丝氨酸(Ser)残基被脯氨酸(Pro)残基取代的铰链区,并且更具体地是铰链序列的第2个丝氨酸被脯氨酸残基取代的铰链区,但不限于此。

[0141] 就一个示例而言,本发明的铰链区可包括或可(主要)由Pro-Pro-Cys-Pro的序列(SEQ ID NO:31)组成,并且免疫球蛋白Fc区可包括SEQ ID NO:31的铰链区序列,但不限于此。

[0142] 本发明的免疫球蛋白Fc区可包括天然铰链区或经修饰的铰链区,以经由一分子免疫球蛋白Fc区的共价键形成二聚体,但不限于此。

[0143] 用作药物载剂的免疫球蛋白Fc区的缺点在于其可能会引起意外的免疫反应,例如,具有效应物功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。这些功能通过免疫球蛋白Fc区与Fc受体或补体的结合或者Fc区的糖基化而发生。此外,极有可能在体内发生Fc本身的不稳定性。

[0144] 本发明人已努力通过取代免疫球蛋白Fc区中铰链区的序列来解决上述问题。具体地,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是强力的糖基化序列被取代用于糖基化的调节或参与链交换的序列被取代的免疫球蛋白Fc区,也可以对应于这两种情况。更具体地,本发明的酶融合蛋白的免疫球蛋白Fc区可以是不发生链交换的免疫球蛋白Fc区。

[0145] 具体地,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是这样的免疫球蛋白Fc区:为了防止链交换和N-糖基化,SEQ ID NO:8的免疫球蛋白Fc区的第2个氨基酸和/或第71个氨基酸被不同氨基酸取代。更具体地,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是SEQ ID NO:8的免疫球蛋白Fc区中1)第2个氨基酸(丝氨酸)被脯氨酸取代的免疫球蛋白Fc区,2)第71个氨基酸(天冬酰胺)被谷氨酰胺取代的免疫球蛋白Fc区,或3)第2个氨基酸被脯氨酸取代且第71个氨基酸被谷氨酰胺取代的免疫球蛋白Fc区,并且具体地,其可以由SEQ ID NO:9的氨基酸序列表示的免疫球蛋白Fc区,但不限于此。除了上面描述的变异之外,免疫球蛋白Fc区作为用于提高治疗酶稳定性的药物载剂可以包括的适当变异。

[0146] 具体地,免疫球蛋白Fc区可以是免疫球蛋白IgG4 Fc的铰链区被IgG1铰链区取代的免疫球蛋白Fc区,但不限于此。

[0147] 在本发明的一个实施方式中,免疫球蛋白Fc的第2个氨基酸被脯氨酸取代且免疫球蛋白Fc的第71个氨基酸被谷氨酰胺取代,从而减少链交换和N-糖基化(实施例1)。

[0148] 如本文所用,术语“链交换”是指当IgG4 Fc被用作蛋白融合体的载剂时,IgG4 Fc与体内存在的IgG4形成杂合体或作为单体存在并改变原始结构以具有低治疗活性的结构的问题,并且先前报道了当融合了蛋白的融合蛋白体用于治疗目的时,存在很大的困难(van der Neut Kofschoten, et al., Science, 317:1554-1557, 2007)。

[0149] 此外,在另一个具体实施方式中,本发明的免疫球蛋白Fc区不仅包括天然氨基酸序列,而且包括其序列类似物。氨基酸序列类似物是指在天然氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基中发生了选自取代、添加、缺失、修饰及其组合的变异。

[0150] 例如,IgG Fc中已知对键合重要的第214至238位、第297至299位、第318至322位或第327至331位的氨基酸残基可用作适合变异的位点。

[0151] 此外,各种类型的类似物都是可能的,例如,能够形成二硫键的位点被去除的类似物、几个N-末端氨基酸从天然Fc去除的类似物、甲硫氨酸残基被添加到天然Fc的N-末端的类似物等。此外,为了去除效应物功能,可去除补体结合位点(例如,C1q结合位点)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)位点。用于制备免疫球蛋白Fc区的序列类似物的技术被公开在国际公开号W0 97/34631、W0 96/32478等中。

[0152] 蛋白质或肽分子中不改变分子整体活性的氨基酸交换在本领域是公知的(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常见的交换发生在氨基酸残基Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly之间。在某些情况下,可通过磷酸化、硫酸化、丙烯酰化(acrylation)、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等修饰氨基酸。

[0153] 此外,上述Fc类似物可以是那些表现出与本发明的Fc区等同的生物活性,但具有对热、pH等提高的Fc区结构稳定性的Fc类似物。

[0154] 此外,这样的Fc区可从分离自人类或动物如牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、豚鼠等的天然型获得,也可以是从转化的动物细胞或微生物获得的重组体或其类似物。在本文中,从天然型获得Fc区的方法可以是从小人或动物生物体分离完整的免疫球蛋白,然后用蛋白酶处理它们的方法。木瓜蛋白酶处理导致消化成Fab和Fc,而胃蛋白酶处理导致消化成pF'c和F(ab)₂。这些片段可经过尺寸排阻色谱法分离出Fc和pF'c。在更具体的实施方式中,Fc区可以是重组免疫球蛋白Fc区,其中人源Fc区获自微生物。

[0155] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是天然聚糖、与其天然型相比增加的聚糖、与其天然型相比减少的聚糖的形式,或是去糖基化或非糖基化的形式。免疫球蛋白Fc聚糖的增加、减少或去除可通过使用常见的方法如化学法、酶促法和使用微生物的基因工程法实现。这里,从Fc区去除了聚糖的免疫球蛋白Fc区显示出对补体(C1q)的结合亲和力的显著降低,以及抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性的降低或去除,因此它不会在体内诱发不必要的免疫反应。在这方面,去糖基化或非糖基化的免疫球蛋白Fc区形式的免疫球蛋白Fc区可以是满足本发明的原始目的——作为药物载剂——的更合适的形式。

[0156] 如本文所用,术语“去糖基化”是指通过酶从Fc区中去除糖,而术语“非糖基化”是指在原核生物中,在更具体的实施方式中是在大肠杆菌中产生的未糖基化的Fc区。

[0157] 同时,免疫球蛋白Fc区可衍生自人类或动物如牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、豚鼠等,而在更具体的实施方式中,其可衍生自人类。

[0158] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或其组合或杂合体的Fc区。在更具体的实施方式中,其可衍生自IgG或IgM——在人类血液中最丰富,而在再更具体的实施方式中,其可衍生自IgG——已知增加配体结合蛋白的半衰期。在更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是IgG4 Fc区,而在再具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是衍生自人IgG4的非糖基化的Fc区,而在最具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列是SEQ ID NO:9且编码其的多核苷酸序列可以是SEQ ID NO:7,但不限于此。

[0159] 如本文所用,术语“组合”意为编码相同来源的单链免疫球蛋白Fc区的多肽与不同来源的单链多肽连接形成二聚体或多聚体。换言之,可由选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE的Fc片段的两个或更多个片段制备二聚体或多聚体。

[0160] 此外,本发明的治疗酶或酶融合蛋白可以是N-末端和/或C-末端未被修饰的那些治疗酶或酶融合蛋白,但是,为了使治疗酶在体内不受蛋白酶的影响以及提高稳定性,其N-末端和/或C-末端被化学修饰或被有机基团保护,或者肽末端被氨基酸的添加等修饰的那些治疗酶或酶融合蛋白也被包括在根据本发明的治疗酶或酶融合蛋白的范围内。当C-末端未被修饰时,根据本发明的治疗酶或酶融合蛋白的末端可具有羧基,但不特别限于此。

[0161] 具体地,由于化学合成的蛋白质的N-末端和C-末端带电,因此可以对N-末端乙酰化和/或对C-末端酰胺化以去除这些电荷,但不特别限于此。

[0162] 如本文所用,术语“N-末端”是指蛋白质或多肽的氨基端,并且可包括氨基端的最末端氨基酸残基,或从该最末端起1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸。本发明的免疫球蛋白Fc区可在N-末端处包括铰链序列,但不限于此。

[0163] 除非在本说明书中另有指定,否则在本发明的具体描述或权利要求中描述的关于根据本发明的“酶”或“融合蛋白”的技术将不仅适用于相应的酶或融合蛋白,而且适用于包括相应的酶或融合蛋白的所有盐(例如,融合蛋白的药学上可接受的盐)或其溶剂化物的范围。因此,尽管在说明书中被简单地描述为“酶”或“融合蛋白”,但相应的描述同样将适用于特定盐、特定溶剂化物以及特定盐的特定溶剂化物。这样的盐形式可以是例如使用任何药学上可接受的盐的形式,但是盐的种类没有特别地限制。那些盐形式可以是例如对个体(例如,哺乳动物)安全且有效的盐形式,但不特别限于此。

[0164] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在医药决策的范围内可有效地用于预期用途而不会引起过度毒性、刺激或变态反应等的物质。

[0165] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指衍生自药学上可接受的无机盐、有机盐或碱的盐。合适的酸的示例可包括盐酸、溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、甲苯-对-磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。衍生自合适的碱的盐的可包括碱金属如钠和钾等;碱土金属如镁;铵等。

[0166] 此外,如本文所用,术语“溶剂化物”是指溶剂分子与根据本发明的酶、融合蛋白或其盐之间形成的复合物。

[0167] 本发明的酶融合蛋白可通过本领域已知的方法制备。

[0168] 在制备本发明的酶融合蛋白的一个实施方式中,制备了重组载体,其中作为治疗

酶的 α -半乳糖苷酶可以以与肽连接体-免疫球蛋白Fc融合的形式表达,然后在细胞系中表达,但方法不限于此,并且酶融合蛋白可通过不同于本文所述方法的其它已知方法制备。本发明的酶融合蛋白可包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,但不限于此。

[0169] 根据本发明的酶融合蛋白可通过经由治疗酶与免疫球蛋白Fc区的融合,在维持治疗酶活性的同时提高其体内稳定性来增加治疗酶的半衰期。具体地,与经修饰的免疫球蛋白Fc区融合的治疗酶具有减少的链交换和糖基化,因此与Fc未融合的治疗酶相比,可具有对溶酶体受体更低的结合亲和力,从而具有长的持续时间,证实这种治疗酶对于目标疾病的治疗是有效的。

[0170] 以上描述也可适用于本发明的其它具体实施方式或方面,但不限于此。

[0171] 本发明的药物组合物可以是用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的药物组合物,所述药物组合物包括药学有效量的酶融合蛋白,并且任选地还包括药学上可接受的赋形剂。

[0172] 根据本发明的组合物的特征在于治疗酶的体内持续时间和稳定性增加。

[0173] 证实了根据本发明的包括 α -半乳糖苷酶的酶融合蛋白可降低由于 α -半乳糖苷酶的缺陷而累积在肾组织中的lyso-Gb3的水平,从而用于治疗由lyso-Gb3累积引起的肾病(例如,肾炎、纤维化、肾衰竭等)。

[0174] 根据本发明的药物组合物可对由法布里病引起或伴有法布里病的肾病表现出预防或治疗效果。

[0175] 关于由于 α -半乳糖苷酶的缺陷或不足而在法布里病患者中发生的肾中Gb3和lyso-Gb3累积以及由此引起的各种肾病,可通过施用根据本发明的包括 α -半乳糖苷酶的融合蛋白来获得预防、改善或治疗其的效果。具体地,由于本发明的酶融合蛋白具有降低肾中lyso-Gb3含量和抑制肾中炎症和纤维化的效果,因此其可表现出预防、改善或治疗由Gb3和lyso-Gb3累积、炎症和纤维化引起的肾病的效果。

[0176] 在本发明中,肾病是指肾细胞或组织或肾相关器官由于各种原因而受损并丧失其功能,而在本发明中,肾病可指代指由法布里病引起或伴有法布里病的肾病,或由法布里病引起并伴有法布里病的肾病,并且具体地,可指代指由于 α -半乳糖苷酶的缺陷或不足而导致Gb3和lyso-Gb3的累积所引起的肾病,但不限于此。肾病的具体示例可包括肾炎、肾小球性肾炎、肾病综合征、肾盂肾炎、肾纤维化、慢性肾病、肾衰竭或肾损伤,但不限于此。

[0177] 本发明的酶融合蛋白可抑制或改善发生在肾中的炎症,从而表现出预防或治疗效果。在本发明的示例性实施方式中,证实了肾组织中lyso-Gb3或Gb3的水平由于本发明的酶融合蛋白而降低,并且还证实了作为炎性标志物的TNF- α 、IL-6、RANTES和/或TNFR1的表达降低,或其分泌受到抑制,表明根据本发明的酶融合蛋白可具有抗炎效果,具体地,在患有炎症的个体中抑制由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的效果(实施例4)。具体地,酶融合蛋白可表现出对发生在肾中的炎症的抑制效果,但不限于特定的组织或器官,只要其可通过细胞因子表达和/或分泌的减少表现出抗炎效果即可。

[0178] 如本文所用,术语“炎症”是由Gb3和lyso-Gb3的累积引起的,并且主要是通过识别脂多糖(LPS)而激活的TLR4介导的炎症反应。已知法布里病所累积的Gb3和lyso-Gb3在结构上类似于LPS,因此能够激活TLR4。器官中累积的Gb3和lyso-Gb3诱导TLR4介导的炎症反应,导致炎性细胞因子的表达。

[0179] 由发生在肾中的炎症引起的疾病的具体示例可包括肾炎、肾小球性肾炎、肾病综合征、肾盂肾炎等,但不限于此,只要这些疾病是发生在肾中、由法布里病引起或伴有法布里病的炎症即可。

[0180] 通过包括酶融合蛋白,本发明的药物组合物可对由法布里病引起或伴有法布里病的肾纤维化表现出预防或治疗效果。

[0181] 如本文所用,术语“纤维化”是指在人体中的组织由于各种应激(感染、化学刺激、辐射等)引起的炎性反应而受损之后,在伤口愈合过程中无法实现正常控制的状况,并且是指在修复反应或反应性反应期间在器官或组织中形成过量的纤维状结缔组织,与在器官或组织中形成正常的纤维状组织不同。在本发明中,“纤维化”可与“纤维化的(fibrosing)”互换使用。在本发明中,纤维化可以是由法布里病引起的或伴有法布里病的肾纤维化。已知在法布里病患者中,由于lyso-Gb3的累积而在肾中发生肾纤维化,而因 α -半乳糖苷酶缺陷而不降解。

[0182] 由于本发明的酶融合蛋白可用于酶替代疗法,因此其可对由于 α -半乳糖苷酶缺陷导致的法布里病所引起或伴有法布里病的肾纤维化表现出预防或治疗效果。

[0183] 肾源性系统性纤维化(NSF)、囊性纤维化等可包括在肾纤维化中,但任何肾纤维化都可以非限制地包括在内,只要它可通过本发明的组合物预防或治疗即可。

[0184] 如本文所用,术语“肾纤维化”是指这样的症状:由于诸如肾组织中发生的过度炎症以及上皮细胞的纤维化的病因所引起的肾组织的纤维化造成的肾功能丧失。由于根据本发明的酶融合蛋白可抑制炎症和纤维化,因此其可对肾纤维化表现出预防或治疗效果。关于本发明的目的,累积在肾中的Gb3和lyso-Gb3可能是肾纤维化的病因之一,但不限于此。

[0185] 具体地,本发明的酶融合蛋白或包括其的药物组合物在施用时可表现出下列特征中的一种或多种:

[0186] (i) 肾组织中lyso-Gb3或Gb3的水平降低;

[0187] (ii) 肾组织中TIMP-1(金属蛋白酶-1的组织抑制剂)的水平降低;

[0188] (iii) 肾组织中1型胶原 α 1的水平降低;

[0189] (iv) 肾组织中 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的水平降低;和

[0190] (v) 肾组织中可溶性胶原和不溶性胶原的水平降低。

[0191] TIMP-1、1型胶原 α 1和 α -SMA都是纤维化水平的指标,并且它们的表达水平根据酶融合蛋白的施用而降低表明酶融合蛋白对纤维化的抑制作用。此外,根据酶融合蛋白的施用,肾组织中可溶性胶原和不溶性胶原的含量降低也意味着纤维化反应受到抑制,表明了预防或改善肾纤维化的效果。

[0192] 在本发明中,肾纤维化可伴有炎症或由炎症引起,但不限于此。由于反复性炎症是组织纤维化的主要病因,因此本发明的肾纤维化可由炎症引起或伴有炎症。

[0193] 具体地,本发明的酶融合蛋白或包括其的药物组合物在施用时可表现出下列特征中的一种或多种:

[0194] (i) 肾组织中TNF- α 的水平降低;

[0195] (ii) 肾组织中IL-6的水平降低;

[0196] (iii) 肾组织中RANTES的水平降低;和

[0197] (iv) 血液中TNFR1的水平降低。

[0198] TNF- α 、IL-6、RANTES和TNFR1都是炎症的指标,并且根据本发明的酶融合蛋白的施用在指标上的降低意味着酶融合蛋白的改善炎症或抗炎效果。

[0199] 如所述,由于根据本发明的酶融合蛋白或包括其的组合物可在肾中表现出改善炎症或抗炎效果并且同时可表现出改善纤维化的效果,因此其不仅可具有抗炎和预防或改善纤维化的效果,而且可对炎症和纤维化一起出现的患病个体表现出优异的治疗效果。

[0200] 具体地,法布里病随着疾病的进展在肾中引起炎症和纤维化,因此根据本发明的酶融合蛋白可用作治疗剂,其能够在早期治疗法布里病并通过其施用来防止疾病的进展。具体地,根据本发明的一个示例性实施方式,由于与用于法布里病的已知治疗剂(阿加糖酶 β)相比,酶融合蛋白对炎症和纤维化表现出优异的抑制效果,因此本发明的酶融合蛋白可作用于由法布里病引起或伴有法布里病的纤维化的有用的治疗剂(实施例4和5)。

[0201] 与此同时,已知肾中的炎症和纤维化会导致慢性肾病、肾损伤、肾衰竭等,造成严重的肾功能损伤。本发明的酶融合蛋白通过抑制炎症和纤维化,具有防止进展到法布里病的后期,之后是慢性肾病、肾衰竭等的优点。

[0202] 本发明的肾病可包括由肾的炎症和纤维化引起的肾病,具体是肾衰竭、肾损伤等,但不限于此。

[0203] 本文所用,术语“肾衰竭”是指肾受损并丧失其功能的疾病,并且可分为慢性肾衰竭和急性肾衰竭。慢性肾衰竭(慢性肾病(CKD))是由于肾功能长期丧失而难以恢复的疾病,并且可能是由肾长期炎症和纤维化导致的肾损伤和功能减退引起的。本发明的酶融合蛋白可通过抑制炎症和纤维化而表现出对肾衰竭的预防或治疗效果。

[0204] 本文所用,“肾损伤”是指具有肾功能障碍的状态,并且其根据严重程度可分为轻度肾损伤、中度肾损伤或重度肾损伤,但不限于此。本发明的酶融合蛋白可通过抑制炎症和纤维化来帮助恢复肾功能,从而表现出对肾损伤的预防或治疗效果。

[0205] 如本文所用,术语“预防”是指通过施用酶融合蛋白或包括其的组合物而抑制或延迟由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的所有活动,而术语“治疗”是指通过施用酶融合蛋白或包括其的组合物而改善或有利地改变由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的症状的所有活动。

[0206] 如本文所用,术语“施用”是指通过任何适当的方法将特定物质引入患者中,而所述组合物的施用途径可以是,但不特别限于能够使所述组合物在体内递送到某一目标的任何常见途径,例如,腹膜内施用、静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用、直肠内施用等。然而,由于肽在口服施用时会被消化,因此用于口服施用的组合物的活性成分优选被包衣或配制以防止在胃中降解,并且具体地,可以以可注射形式施用。此外,药物组合物可使用能够将活性成分输送到靶细胞中的任意装置来施用。

[0207] 本发明组合物的总有效量可以以单剂量向患者施用,也可以根据分级治疗方案以多剂量长时期施用。在本发明的药物组合物中,活性成分的量可根据疾病严重程度而改变。具体地,本发明的融合蛋白的优选总日剂量可以是每1kg患者体重约0.0001mg至500mg。然而,融合蛋白的有效剂量是考虑了除药物组合物的施用途径和治疗频率以外的各种因素包括患者的年龄、体重、健康状况、性别、疾病严重程度、饮食和排泄率等确定的。在这方面,本领域技术人员可容易地确定用于本发明组合物的特定用途的有效剂量。根据本发明的药物

组合物不特别限于配制、施用途和施用方法,只要其表现出本发明的效果即可。

[0208] 本发明的酶融合蛋白的实际剂量是基于用作活性成分的治疗酶的类型连同各种因素如待治疗的疾病、施用途、患者的年龄、性别和体重、疾病严重程度等确定的。由于本发明的酶融合蛋白具有非常优异的血液持续时间和体内活性,因此可显著降低包括本发明的酶融合蛋白的药物制剂的施用的剂量、次数和频率。

[0209] 具体地,与不呈融合蛋白形式的酶相比,本发明的酶融合蛋白由于高稳定性而具有增加的持续时间并且可长时间维持酶活性。在本发明的一个示例性实施方式中,证实了酶融合蛋白不仅可在器官中,甚至在施用后的长时间都得以维持,而且可在肾组织中长时间分布(实施例2)。因此,与根据本发明的酶融合蛋白以外的酶相比,所述融合蛋白可具有增加的对肾的组织靶向性,并且可通过连续暴露于用于治疗的靶组织而表现出优异的药理学效果。

[0210] 根据本发明的酶融合蛋白不仅可在施用后于组织中长时间维持其浓度处于预定水平或更高,而且可在特定组织中,特别是在肾中显示出高分布,因此酶融合蛋白可有效地用于治疗靶向相应组织的疾病。在本发明的一个示例性实施方式中,证实了当通过降低施用频率将酶融合蛋白向 α -半乳糖苷酶基因敲除小鼠施用时,治疗效果等于或优于融合蛋白以外的酶的治疗效果。因此,与酶融合蛋白以外的酶相比,可降低所述融合蛋白向有需要的个体的施用频率,但不限于此。

[0211] 与本发明的酶融合蛋白不同,未呈融合蛋白形式的酶可指代不结合载剂(例如,免疫球蛋白Fc区)的酶本身。其示例可包括Fabrazyme®(阿加糖酶 β),但不限于此。

[0212] 具体地,根据本发明的酶融合蛋白可以以每1kg患者体重约0.0001 μ g至约500mg的量,具体地,每1kg患者体重约0.001mg至约100mg,具体地,0.01mg至50mg,更具体地,约0.1mg至10mg,每周施用一次,每两周施用一次,每四周施用一次,或每月施用一次,并且即使增加施用间隔,酶融合蛋白的药理学活性在体内也得以维持,因此,可增大患者的便利性。

[0213] 根据本发明的药物组合物还可包括药学上可接受的载剂、媒剂(赋形剂)或稀释剂。这些载剂可以是非天然存在的载剂。

[0214] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指足以表现出治疗效果而不引起副作用的量,并且可由本领域技术人员根据医学领域中公知的因素如疾病种类、患者的年龄、重量、健康状况、性别和药物敏感性、施用途、施用方法、施用频率、治疗持续时间、共混或同时使用的药物等容易地确定。

[0215] 药学上可接受的载剂可包括:对于口服施用而言,粘合剂、助流剂、崩解剂、媒剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、调味剂等;对于注射而言,缓冲剂、防腐剂、镇痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等,其可在混合物中使用;以及对于局部施用而言,碱、媒剂、润滑剂、防腐剂等。

[0216] 可与上述药学上可接受的载剂组合,以各种方式制备本发明药物组合物的制剂。例如,对于口服施用而言,药物组合物可配制成片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆剂、薄片(wafer)等。对于注射而言,药物组合物可配制成单位剂量安瓿或多剂量容器。此外,药物组合物也可配制成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂等。

[0217] 同时,适用于配制的载剂、媒剂和稀释剂的示例可包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖

醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等。另外,组合物还可包含填料、抗凝剂、润滑剂、保湿剂、调味剂、乳化剂、防腐剂等。

[0218] 此外,酶融合蛋白可通过与被批准作为药物的各种载剂如生理盐水或有机溶剂混合来使用。为了提高稳定性或吸收性,碳水化合物(如葡萄糖、蔗糖或右旋糖苷)以及抗氧化剂(如抗坏血酸和谷胱甘肽)、螯合剂、低分子量蛋白质或其它稳定剂可用作药物。

[0219] 药物组合物可包含但不限于0.01%至99%(w/v)的量的上述成分(活性成分)。

[0220] 本发明的另一方面提供了预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的方法,所述方法包括向个体施用所述酶融合蛋白或包括其的组合物的步骤。

[0221] 酶融合蛋白、组合物、肾病、预防和治疗与上述相同。

[0222] 由于本发明的酶融合蛋白可包括能够预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的治疗酶,因此可在疑似患有肾病的个体中通过施用所述酶融合蛋白或包括所述酶融合蛋白的药物组合物来预防或治疗所述疾病。

[0223] 如本文所用,术语“个体”是指疑似患有肾病的个体,而疑似患有肾病的个体是指哺乳动物(包括小鼠、家畜等),包括已经患有相应疾病或可能发展出该疾病的人,但个体包括任何个体而不受限制,只要它们可用本发明的酶融合蛋白或包括其的组合物治疗即可。具体地,个体可以是已经发展出了法布里病或有高法布里病风险的个体,但是任何个体都被包括在本发明的范围内而没有限制,只要该个体发展出了或可能发展与法布里病相关的肾病即可。

[0224] 本发明的方法可包括施用药学有效量的包括酶融合蛋白的药物组合物。适当的总日剂量可在从业者正确的医学判断的范围内确定,并且可分剂量一次或几次施用所述组合物。然而,关于本发明的目的,根据各种因素,包括所要达到的响应的种类和程度、特定的组合物是否包含偶尔与其一起使用的其它剂、患者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、组合物的排泄率、治疗持续时间、与该特定的组合物组合或同时使用的其它药物以及医学领域公知的类似因素,优选地,任意特定患者的特定治疗有效剂量被有差异地施加。

[0225] 施用途径、施用剂量和用法与上述相同。

[0226] 与此同时,预防或治疗纤维化的方法可以是组合疗法,其进一步包括施用一种或多种对肾病具有治疗活性的化合物或材料,但该方法不限于此。

[0227] 如本文所用,术语“组合”必须理解为指同时、分开或相继施用。当施用是相继施用或分开施用时,允许施用第二成分的间隔必须是不应失去该组合的有利效果的间隔。

[0228] 本发明的又一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途。

[0229] 酶融合蛋白、组合物、肾病、预防和治疗与上述相同。

[0230] 本发明的又一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在制备用于由法布里病引起或伴有法布里病的肾病的预防剂或治疗剂(药物组合物)中的用途。

[0231] 酶融合蛋白、组合物、肾病、预防和治疗与上述相同。

[0232] 本发明的又一方面提供了抗炎组合物,其包括所述酶融合蛋白。

[0233] 酶融合蛋白、组合物、肾病、预防和治疗与上述相同。

[0234] 本发明的酶融合蛋白可通过降低(i)肾组织中TNF- α 的水平;(ii)肾组织中IL-6的水平;(iii)肾组织中RANTES的水平;和/或(iv)血液中TNFR1的水平而具有减轻或改善炎症的抗炎效果。

[0235] 本发明的酶融合蛋白可通过抑制由于Gb3和lyso-Gb3在肾中的累积而发生的炎症反应而具有抗炎效果。

[0236] 具体地,根据本发明的包括酶融合蛋白的抗炎组合物可以是用于预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的药物组合物,但不限于此。

[0237] 酶融合蛋白及其抗炎效果和药物组合物与上述相同。

[0238] 本发明的另一方面提供了预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用所述酶融合蛋白或包括其的组合物的步骤。

[0239] 酶融合蛋白和包括其的组合物以及炎症与上述相同。

[0240] 如本文所用,术语“预防”是指通过施用酶融合蛋白或包括其的组合物而抑制或延迟由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的所有活动,而术语“治疗”是指通过施用酶融合蛋白或包括其的组合物而改善或有利地改变由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的所有活动。

[0241] 如本文所用,术语“施用”是指通过任何适当的方法将特定物质引入患者中,而所述组合物的施途径可以是,但不特别限于能够使所述组合物在体内递送到某一目标的任何常见途径,例如,腹膜内施用、静脉内施用、肌内施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用、直肠内施用等。

[0242] 如本文所用,术语个体是指疑似患有炎症的个体,而疑似患有炎症的个体是指哺乳动物(包括小鼠、家畜等),包括已经患有相应疾病或可能发展出该疾病的人,但个体包括任何个体而不受限制,只要它们可用本发明的酶融合蛋白或包括其的组合物治疗即可。具体地,个体可以是已经发展出了法布里病或有高法布里病风险的个体,但是任何个体都被包括在本发明的范围内而没有限制,只要该个体发展出了或可能发展与法布里病相关的炎症即可。

[0243] 本发明的方法可包括施用药学有效量的包括酶融合蛋白的药物组合物。适当的总日剂量可在从业者正确的医学判断的范围内确定,并且可分剂量一次或几次施用所述组合物。然而,关于本发明的目的,根据各种因素,包括所要达到的响应的种类和程度、特定的组合物是否包含偶尔与其一起使用的其它剂、患者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、组合物的排泄率、治疗持续时间、与该特定的组合物组合或同时使用的其它药物以及医学领域公知的类似因素,优选地,任意特定患者的特定治疗有效剂量被有差异地施加。酶融合蛋白的施用剂量和用法与上述相同。

[0244] 本发明的另一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在预防或治疗由法布里病引起或伴有法布里病的炎症中的用途。

[0245] 本发明的另一方面提供了所述酶融合蛋白或包括其的组合物在制备用于由法布里病引起或伴有法布里病的炎症的预防剂或治疗剂(药物组合物)中的用途。

[0246] 酶融合蛋白或包括其的组合物、炎症、预防和治疗与上述相同。

[0247] 在下文中,将参考示例性实施方式更详细地描述本发明。然而,这些示例性实施方

式仅用于说明目的,并且本发明的范围不旨在由这些示例性实施方式来限制。

[0248] 实施例1: α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)的制备

[0249] 为了产生包括反向平行二聚体形式的治疗酶的 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(在下文中,可与酶融合蛋白互换使用),本发明人在基因水平上融合了天然 α -半乳糖苷酶、连接体(SEQ ID NO:10)和Fc免疫球蛋白区(SEQ ID NO:7),并将产物插入表达载体中。

[0250] 为了去除构建的酶融合蛋白序列的Fc区中的链交换和N-糖基化位点,使用了定点诱变PCR技术。

[0251] 具体地,使用SEQ ID NO:1和2的引物将参与链交换的Fc区(SEQ ID NO:8)的第2个氨基酸丝氨酸取代为脯氨酸,并使用SEQ ID NO:3和4的引物将参与N-糖基化的Fc区的第71个氨基酸天冬酰胺取代为谷氨酰胺。

[0252] [表1]

[0253] 诱变引物

引物	序列	SEQ ID NO.
[0254] Fc(S2P)_F	5'- CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCT-3'	1
Fc(S2P)_R	5'- AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCCGCCACCGCCAG-3'	2
Fc(N7IQ)_F	5'- AGCCGCGGGAGGAGCAGTCCAAAGCACGTACCGTGTGGTCAG-3'	3
Fc(N7IQ)_R	5'- CTGACCACACGGTAACGTCCTTGGAACTGCTCCTCCGCGGCT-3'	4

[0255] 使用限制性内切酶将编码合成的 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白的多核苷酸插入到表达载体XOGC载体中。BamHI和XhoI两者都是不切割 α -半乳糖苷酶和Fc免疫球蛋白区的限制性内切酶。将用上述限制性内切酶切割的 α -半乳糖苷酶-Fc插入到用相同限制性内切酶切割的XOGC载体中,从而完成了能够表达 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白的载体。当免疫球蛋白Fc区形成二聚体时, α -半乳糖苷酶形成反向平行二聚体。

[0256] α -半乳糖苷酶-Fc的DNA和蛋白质序列如下表2中。在下表2中,蛋白质序列的下划线部分代表信号序列,粗体部分代表经取代的氨基酸,以及斜体部分代表连接体。

[0257] [表2]

[0258]

名称	序列	SEQ ID NO.
<p>α-半乳糖苷酶-Fc</p>	<p>DNA</p> <p>ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAAGCGTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAAGC TGGAAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCOCTGG GAGTTTGGAA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTGAT GGTGTACT GTGACAGTTT GGAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTA TATGTGCCC TTCAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTC TGGACCAGGG GGTGGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACCTAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAAGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACCT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT</p>	<p>12</p>

[0259]

		GTAGCTATGA TAAACC9GCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTCA TCACACAGCT CCTCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAAGTTAA GAAATCACAT AAATCCACA GGCACGTGTT TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC GCGGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CCGGGGAGG CGGCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGG AGGTAGCCCA CCATGCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTCCC CCCAAAACC AAGGACACC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CCGGGGAGGA GCAGTTCCAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG GGTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGTCTC CAACAAAGC CTCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACC TGCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCG ACGGCTCCTT CTCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAG CAGAAGACC TCTCCTGTC TCTGGTAAA TGA	
	蛋白质	MQLNPELHL GCALALEFLA LVSVDIPGAR ALDNLGARTP TNGVLHVERF MCNLDQEEP DSCISEKLFM EMAELWVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAPOE DSEGRLOADP QRPFGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPQSPG YYDIDAQTEA DWGVDLLKFD GCYCDLENL ADGYKMSLA LNRTRRSIVY	13
		SCEWPLYMWP FOKFNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSVKS IK SILDWTSENO ERIVDVAGPG GWNDPIMLVI GNFGLSVNQQ VTQMALVAIN AAPLFMSNDL RHISPOAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAWA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EYTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTEPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLHGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEVESNGQP ENHYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSEW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	

[0260] 本实施例中制备的表达酶融合蛋白的载体被命名为 α -半乳糖苷酶-Fc。实施例2： α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)的组织分布的检查

[0261] 评估了在向 α -半乳糖苷酶基因敲除小鼠(α -Gal A KO, Jackson laboratory Stock No.003535)施用后 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)在组织中的分布。

[0262] 具体地,分别制备并注射了第1组:6.0mg/kg的 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(皮下施用)和第2组:3.0mg/kg的 α -半乳糖苷酶A(阿加糖酶 β)(静脉内施用)。分别在24小时、168小时、240小时、336小时、408小时、504小时、672小时移除器官(n=3),然后通过酶活性测定测量并比较组织(肾和脾)中物质的浓度。

[0263] 为了测量各组织中的酶活性,通过在37°C下温度稳定化30分钟来制备4-甲基伞形酮 α -D-吡喃半乳糖苷(4-methylumbelliferyl α -D-galactopyranoside, 4-MU- α -Gal)——其已知是 α -半乳糖苷酶的底物,然后在37°C下使底物溶液和组织样品反应60分钟。通过测量最终产生的4-甲基伞形酮(4-MU)的荧光来评估 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白的酶活性。利用非配对T检验(**~***p<0.01~0.001)进行统计分析以比较对照组与实验组之间的统计学显著性。

[0264] 结果,在 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白施用组中,皮下施用后上至504小时在组织中检测到了施用的酶。特别是在肾中,24小时后未检测到阿加糖酶 β ,而 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白在408小时前显示出稳定分布(图1)。

[0265] 关于组间的组织分布,在肾中观察到检测程度的最大差异。在肾中,检测到显著高的浓度的根据本发明的 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白,而未检测到阿加糖酶 β 。

[0266] α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白的组织分布结果汇总在下表3中。

[0267] [表3]

材料	种类	AUC _{last} (ng*hr/mL or ng*hr/g)	C _{max} (ng/mL)	MRT _{last} (hr)
[0268] α -半乳糖苷酶-Fc 融合蛋白	肾	136657.8	404.5	204.9
	脾	1544744.3	4132.1	287.1
阿加糖酶 β	肾	NC	NC	NC
	脾	1948878.4	13040.5	134.4

[0269] *NC:未计算

[0270] 上述实验结果意味着, α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白在肾中表现出高分布的同时可得到长时间段维持,表明在 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白递送至身体组织后,持续且长期的酶暴露可对受法布里病影响的主要器官表现出优异的治疗效果。

[0271] 实施例3: α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)的施用的体内功效检查

[0272] 为了评估根据 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)对 α -半乳糖苷酶基因敲除小鼠的施用的功效,制备了4组小鼠。第一组包括野生型(WT)小鼠(n=6),向其施用 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白的媒剂。第二组等其余为 α -半乳糖苷酶基因敲除小鼠(法布里病小鼠;n=7)实验组;第2组:施用 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白媒剂,第3组:1.0mg/kg阿加糖酶 β (每2周一次,静脉内施用),以及第4组:2.0mg/kg α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(每4周一次,皮下施用)。施用20周后,测量肾中的中性糖鞘脂和lyso-Gb3(神经酰胺三己糖苷)的含量,并测量肾组织中的蛋白量以校正lyso-Gb3含量。

[0273] 为测量肾组织中的lyso-Gb3,对肾组织匀浆上清液进行预处理,然后使用液相色谱串联质谱仪进行定量和比较。采用单因素ANOVA (** $p < 0.001$) 进行统计分析,以比较媒剂组(对照组)和实验组之间的统计学显著性。

[0274] 作为测量lyso-Gb3含量的结果,如图2所示,证实了在重复施用20周后, α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白组显示出肾组织中lyso-Gb3的量显著减少。lyso-Gb3含量的降低表明融合蛋白可以对lyso-Gb3累积引起的疾病具有治疗效果。

[0275] 实施例4: α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)的抗炎效果的检查

[0276] 检查根据20周 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)的施用改善炎症的效果。为此,使用实施例3中使用的正常小鼠和法布里病小鼠的肾组织(20周重复施用)检查炎症标志物TNF- α 、IL-6和RANTES的mRNA水平。具体地,使用RNA提取试剂盒(Qiagen)从肾组织中收获RNA,然后使用cDNA合成试剂盒合成cDNA,并使用合成的cDNA进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。使用下列特异性引物进行RT-PCR。

[0277] [表4]

炎性标志物	引物序列	SEQ ID NO.
TNF- α	正向: 5'- GATCTCAAAGACAACCAACATGTG -3'	15
	反向: 5'- CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG -3'	16
IL-6	正向: 5'- CCAGTTGCCTTCTTGGGACT -3'	17
	反向: 5'- GGICTGTGGGAGTGGTATCC -3'	18
RANTES	正向: 5'- CCTCACCATATGGCTCGGAC -3'	19
	反向: 5'- ACGACTGCAAGATTGGAGCA -3'	20
18s	正向: 5'- TAACGAACGAGACTCTGGCAT -3'	21
	反向: 5'- CGGACATCTAAGGGCATCACAG -3'	22

[0278] 此外,根据制造商的说明,使用TNFR1 ELISA试剂盒(R&D系统)测量和定量通过采血采集的血清样品中的炎症标志物TNFR1的血液水平。采用单因素ANOVA (*~*** $p < 0.05 \sim 0.001$)或非配对t检验(#~### $p < 0.05 \sim 0.001$)进行统计分析,以比较媒剂组(对照组)与实验组之间的统计学显著性。

[0280] 结果,证实了当重复施用 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白20周时,对照 α -半乳糖苷酶基因敲除小鼠组中肾组织的增加的炎症显著减少(图3)。

[0281] 实施例5: α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白(α -半乳糖苷酶-Fc)改善纤维化的效果的检查

[0282] 基于实施例4中证实的改善炎症的效果,评估通过 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白预防法布里病的肾纤维化的效果。为此,使用实施例3中使用的正常小鼠和法布里病小鼠的肾组织(20周重复施用)检查纤维化标志物TIMP-1、1型胶原 $\alpha 1$ 和 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白)的mRNA水平。具体地,使用RNA提取试剂盒(Qiagen)从肾组织中收获RNA,然后使用cDNA合成试剂盒合成cDNA,并使用合成的cDNA进行RT-PCR。使用下列特异性引物进行RT-PCR。

[0283] [表5]

纤维化标志物	引物序列	SEQ ID NO.
TIMP-1	正向: 5'- CCTTGCAAACCTGGAGAGTGACA -3'	23
	反向: 5'- AGGCAAAGTGATCGCTCTGGT -3'	24
I型胶原 $\alpha 1$	正向: 5'- CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC -3'	25
	反向: 5'- AGAGCATGACCGATGGATTTC -3'	26
α -SMA	正向: 5'- GTGACATCGACATCAGGAAAGA -3'	27
	反向: 5'- GATCCACATCTGCTGGAAGG -3'	28
18s	正向: 5'- TAACGAACGAGACTCTGGCAT -3'	29
	反向: 5'- CGGACATCTAAGGGCATCACAG -3'	30

[0285] 此外,还根据胶原测定试剂盒 (Biocolor) 的手册测量和定量了肾组织中的可溶性胶原和不溶性胶原的含量。采用单因素ANOVA (*~***p<0.05~0.001) 进行统计分析,以比较媒介组(对照组)与实验组之间的统计学显著性。

[0286] 结果,证实了当重复施用 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白时,与媒介对照组和阿加糖酶 β 已知作为法布里病的治疗剂的阿加糖酶 β 施用组相比,观察到预防和治疗肾组织中纤维化的优异功效(图4)。

[0287] 上述实验结果表明,作为本发明的酶融合蛋白的 α -半乳糖苷酶-Fc融合蛋白由于其长的持续时间和高组织靶向性,具有改善肾中的由法布里病引起或伴有法布里病的炎症和纤维化的优异效果。

[0288] 基于以上所述,本发明所属领域技术人员将理解,在不改变本发明的技术精神或本质特征的情况下,本发明可以以不同的具体形式实现。在这方面,应当理解上述实施方式不是限制性的,而在所有方面都是说明性的。本公开的范围由所附权利要求而非由在其之前的描述来限定,因此落入这些权利要求的边界或此类边界的等同物之内的所有变化和修改因此都意图被这些权利要求所囊括。

<110>	韩美药品株式会社	
<120>	治疗酶融合蛋白在预防和治疗由法布里病引起或伴有法布里病的肾病中的用途	
<130>	OPA21366-PCT	
<150>	KR 10-2020-0152247	
<151>	2020-11-13	
<160>	31	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fc (S2P)_F	
<400>	1	
	ctggcgggtgg cggatcgcca ccatgcccag cacctgagtt cct	43
<210>	2	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fc (S2P)_R	
<400>	2	
	aggaactcag gtgctgggca tgggtggcgat ccgccaccgc cag	43
<210>	3	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fc (N71Q)_F	
<400>	3	
	agccgcggga ggagcagttc caaagcacgt accgtgtggt cag	43
<210>	4	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fc (N71Q)_R	

35	40	45
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile		
50	55	60
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly		
65	70	75
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met		
85	90	95
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg		
100	105	110
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly		
115	120	125
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly		
130	135	140
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala		
145	150	155
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser		
165	170	175
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn		
180	185	190
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met		
195	200	205
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn		
210	215	220
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys		
225	230	235
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val		
245	250	255
Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn		
260	265	270
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala		
275	280	285
Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser		
290	295	300
Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn		
305	310	315
Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn		
325	330	335
Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala		
340	345	350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
 355 360 365
 Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
 370 375 380
 Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
 405 410 415
 Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 420 425

<210> 7

<211> 666

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc变体

<400> 7

ccaccatgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa 60
 cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 120
 agccaggaag accctgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 180
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttc caaagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 240
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 300
 ggccctcccat cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 360
 caggtgtaca cctgcccc atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 420
 tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480
 ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 540
 tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaacgtctt ctatgctcc 600
 gtgatcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctctgggt 660
 aatga 666

<210> 8

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc变体

<400> 8

Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

	20		25		30														
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln				
	35						40					45							
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
	50					55					60								
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu				
65					70					75					80				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys				
				85					90					95					
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys				
			100						105					110					
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser				
	115							120						125					
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys				
	130						135							140					
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln				
145					150						155				160				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly				
					165						170				175				
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln				
			180								185				190				
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn				
			195								200				205				
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys							
	210														220				
<210>	9																		
<211>	221																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	Fc变体																		
<400>	9																		
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
1				5					10					15					
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu				
			20						25					30					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln				
			35						40					45					
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				

50	55	60
Pro Arg Glu Glu Gln Phe	Gln Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu
65	70	75
Thr Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys
	85	90
Val Ser Asn Lys Gly Leu	Pro Ser Ser Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys
	100	105
Ala Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser
	115	120
Gln Glu Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val Lys
	130	135
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln
145	150	155
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly
	165	170
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	Arg Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln
	180	185
Glu Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn
	195	200
His Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Leu	Gly Lys
	210	215
		220

<210> 10

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接体

<400> 10

ggcggcggag gttcaggtgg tgggtggctct ggcggtggag ggtcgggggg aggcggctct 60

ggaggagggg gctccggtgg gggaggtagc 90

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接体

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1	5	10
		15

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	20				25					30					
<210>	12														
<211>	2043														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	α半乳糖苷酶-Fc融合蛋白														
<400>	12														
	atgcagctga	ggaacccaga	actacatctg	ggctgcgcgc	ttgcgcttcg	cttcctggcc								60	
	ctcgtttcct	gggacatccc	tggggctaga	gcaactggaca	atggattggc	aaggacgcct								120	
	accatgggct	ggctgcaactg	ggagcgettc	atgtgcaacc	ttgactgcca	ggaagagcca								180	
	gattcctgca	tcagtgagaa	gctcttcatg	gagatggcag	agctcatggt	ctcagaaggc								240	
	tggaaggatg	caggttatga	gtacctctgc	attgatgact	gttggatggc	tccccaaga								300	
	gattcagaag	gcagacttca	ggcagaccct	cagcgttttc	ctcatgggat	tgccagcta								360	
	gctaattatg	ttcacagcaa	aggactgaag	ctagggattt	atgcagatgt	tggaaataaa								420	
	acctgcgcag	gcttccctgg	gagttttgga	tactacgaca	ttgatgccca	gacctttgct								480	
	gactggggag	tagatctgct	aaaatttgat	ggttgttact	gtgacagttt	ggaaaatttg								540	
	gcagatggtt	ataagcacat	gtccttggcc	ctgaatagga	ctggcagaag	cattgtgtac								600	
	tctctgtgag	ggcctcttta	tatgtggccc	tttcaaaagc	ccaattatac	agaaatccga								660	
	cagtactgca	atcactggcg	aaattttgct	gacattgatg	attcctggaa	aagtataaag								720	
	agtatcttgg	actggacatc	ttttaaccag	gagagaattg	ttgatgttgc	tggaccaggg								780	
	ggttggaatg	accagatat	gtagtgatt	ggcaactttg	gcctcagctg	gaatcagcaa								840	
	gtaactcaga	tggccctctg	ggctatcatg	gctgctcctt	tattcatgtc	taatgacctc								900	
	cgacacatca	gccctcaagc	caaagctctc	cttcaggata	aggacgtaat	tgccatcaat								960	
	caggaccctc	tgggcaagca	agggtaccag	cttagacagg	gagacaactt	tgaagtgtgg								1020	
	gaacgacctc	tctcaggctt	agcctgggct	gtagctatga	taaaccggca	ggagattggt								1080	
	ggacctcgct	cttataccat	cgcagttgct	tcctgggta	aaggagtggc	ctgtaatcct								1140	
	gcctgcttca	tcacacagct	cctccctgtg	aaaaggaagc	tagggttcta	tgaatggact								1200	
	tcaaggttaa	gaagtcacat	aaatcccaca	ggcaactggt	tgcttcagct	agaaaataca								1260	
	atgcagatgt	cattaaaaga	cttacttggc	ggcggagggt	caggtggtgg	tggctctggc								1320	
	ggtggagggt	cggggggagg	cggctctgga	ggagggggct	ccggtggggg	aggtagccca								1380	
	ccatgcccag	cacctgagtt	cctgggggga	ccatcagtct	tctgttccc	cccaaaacc								1440	
	aaggacacc	tcatgatctc	ccggaccct	gaggtccat	gcgtggtggt	ggacgtgagc								1500	
	caggaagacc	ctgaggtcca	gttcaactgg	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc								1560	
	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagttccaa	agcacgtacc	gtgtggtcag	cgctctcacc								1620	
	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaggc								1680	
	ctcccactct	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag								1740	
	gtgtacacc	tgccccatc	ccaggaggag	atgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc								1800	

ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1860
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
 agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga acgtcttctc atgctccgtg 1980
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 2040
 tga 2043

<210> 13

<211> 680

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α 半乳糖苷酶-Fc融合蛋白

<400> 13

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
 20 25 30
 Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
 35 40 45
 Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
 50 55 60
 Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
 65 70 75 80
 Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
 85 90 95
 Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
 100 105 110
 Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
 115 120 125
 Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
 130 135 140
 Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160
 Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175
 Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190
 Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205
 Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn

210	215	220
His Trp Arg Asn Phe	Ala Asp Ile Asp Asp Ser	Trp Lys Ser Ile Lys
225	230	235
Ser Ile Leu Asp Trp Thr	Ser Phe Asn Gln Glu Arg	Ile Val Asp Val
245	250	255
Ala Gly Pro Gly Gly Trp	Asn Asp Pro Asp Met Leu	Val Ile Gly Asn
260	265	270
Phe Gly Leu Ser Trp Asn	Gln Gln Val Thr Gln Met	Ala Leu Trp Ala
275	280	285
Ile Met Ala Ala Pro Leu	Phe Met Ser Asn Asp Leu	Arg His Ile Ser
290	295	300
Pro Gln Ala Lys Ala Leu	Leu Gln Asp Lys Asp Val	Ile Ala Ile Asn
305	310	315
Gln Asp Pro Leu Gly Lys	Gln Gly Tyr Gln Leu Arg	Gln Gly Asp Asn
325	330	335
Phe Glu Val Trp Glu Arg	Pro Leu Ser Gly Leu Ala	Trp Ala Val Ala
340	345	350
Met Ile Asn Arg Gln Glu	Ile Gly Gly Pro Arg Ser	Tyr Thr Ile Ala
355	360	365
Val Ala Ser Leu Gly Lys	Gly Val Ala Cys Asn Pro	Ala Cys Phe Ile
370	375	380
Thr Gln Leu Leu Pro Val	Lys Arg Lys Leu Gly Phe	Tyr Glu Trp Thr
385	390	395
Ser Arg Leu Arg Ser His	Ile Asn Pro Thr Gly Thr	Val Leu Leu Gln
405	410	415
Leu Glu Asn Thr Met Gln	Met Ser Leu Lys Asp Leu	Leu Gly Gly Gly
420	425	430
Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly
435	440	445
Ser Gly Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Pro	Pro Cys Pro Ala
450	455	460
Pro Glu Phe Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro
465	470	475
Lys Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val
485	490	495
Val Asp Val Ser Gln Glu	Asp Pro Glu Val Gln Phe	Asn Trp Tyr Val
500	505	510
Asp Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln
515	520	525

Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 580 585 590
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 595 600 605
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 610 615 620
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 625 630 635 640
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 645 650 655
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 660 665 670
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 675 680

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TNF-a_F

<400> 15

gatctcaaag acaaccaaca tgtg

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

24

<220>		
<223>	TNF-a_R	
<400>	16	
	ctccagctgg aagactcctc ccag	24
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IL-6_F	
<400>	17	
	ccagttgcct tcttgggact	20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IL-6_R	
<400>	18	
	ggtctgttgg gagtggatc c	21
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RANTES_F	
<400>	19	
	cctcaccata tggctcggac	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RANTES_R	
<400>	20	
	acgactgcaa gattggagca	20
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	18s_F	
<400>	21	
	taacgaacga gactctggca t	21
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	18s_R	
<400>	22	
	eggacatcta agggcatcac ag	22
<210>	23	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TIMP-1_F	
<400>	23	
	ccttgcaaac tggagagtga ca	22
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TIMP-1_R	
<400>	24	
	aggcaaagtg atcgctctgg t	21
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Colla1_F	
<400>	25	
	ccttcttgag gttgccagtc	20
<210>	26	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Colla1_R	
<400>	26	
	agagcatgac cgatggattc	20
<210>	27	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	a-SMA_F	
<400>	27	
	gtgacatcga catcaggaaa ga	22
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	a-SMA_R	
<400>	28	
	gatccacatc tgctggaagg	20
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	18s_F	
<400>	29	
	taacgaacga gactctggca t	21
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	18s_R	
<400>	30	
	cggacatcta agggcatcac ag	22
<210>	31	

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区
<400> 31
Pro Pro Cys Pro
1

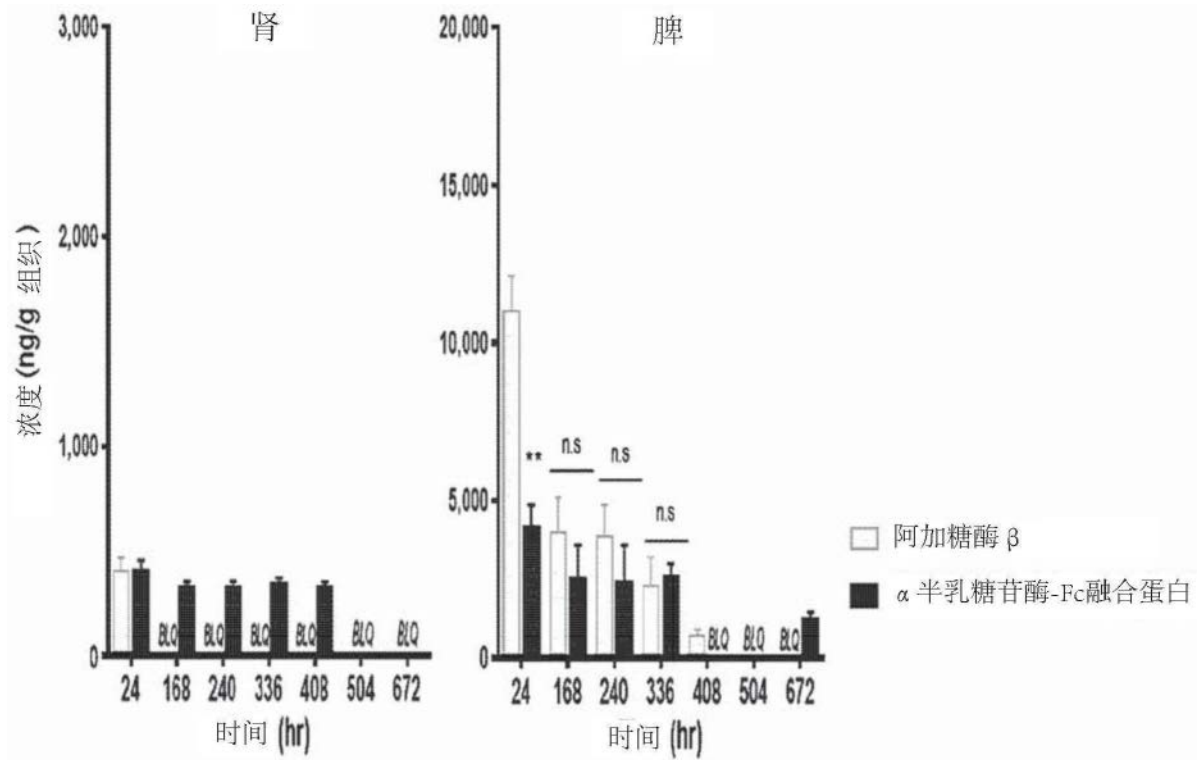


图1

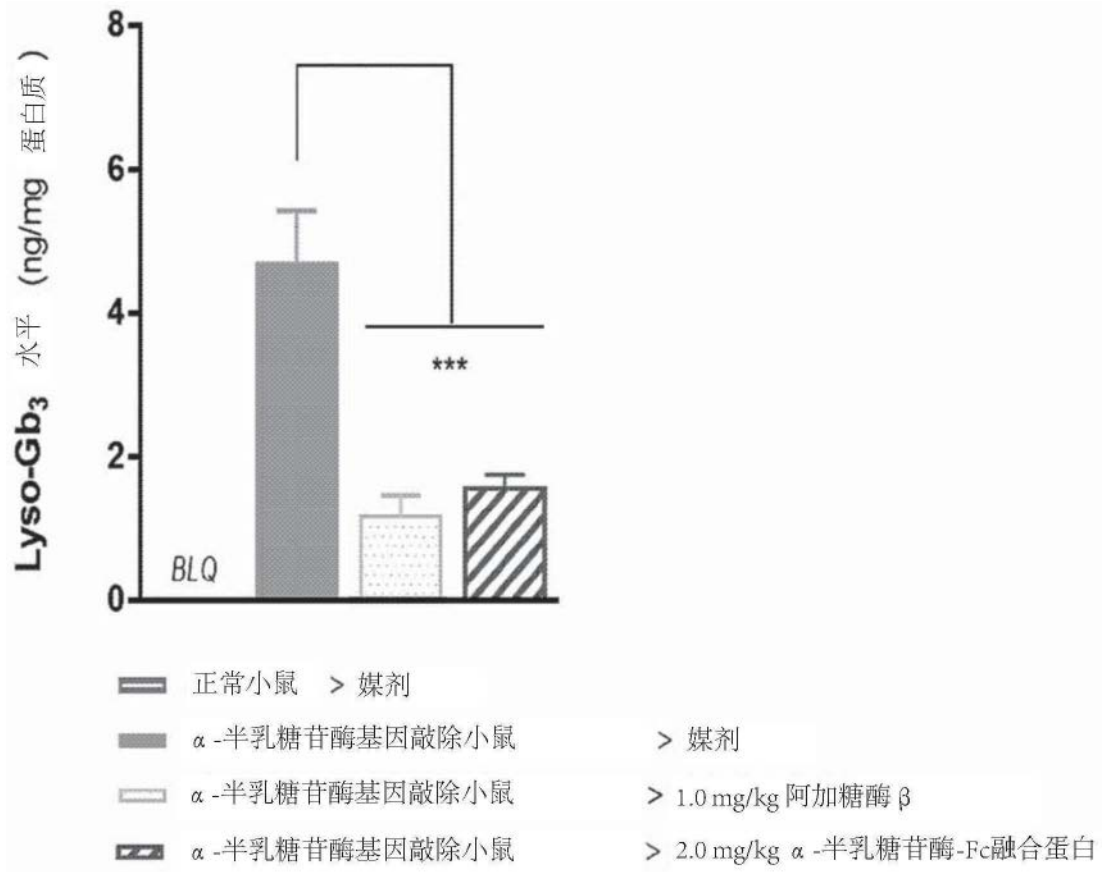


图2

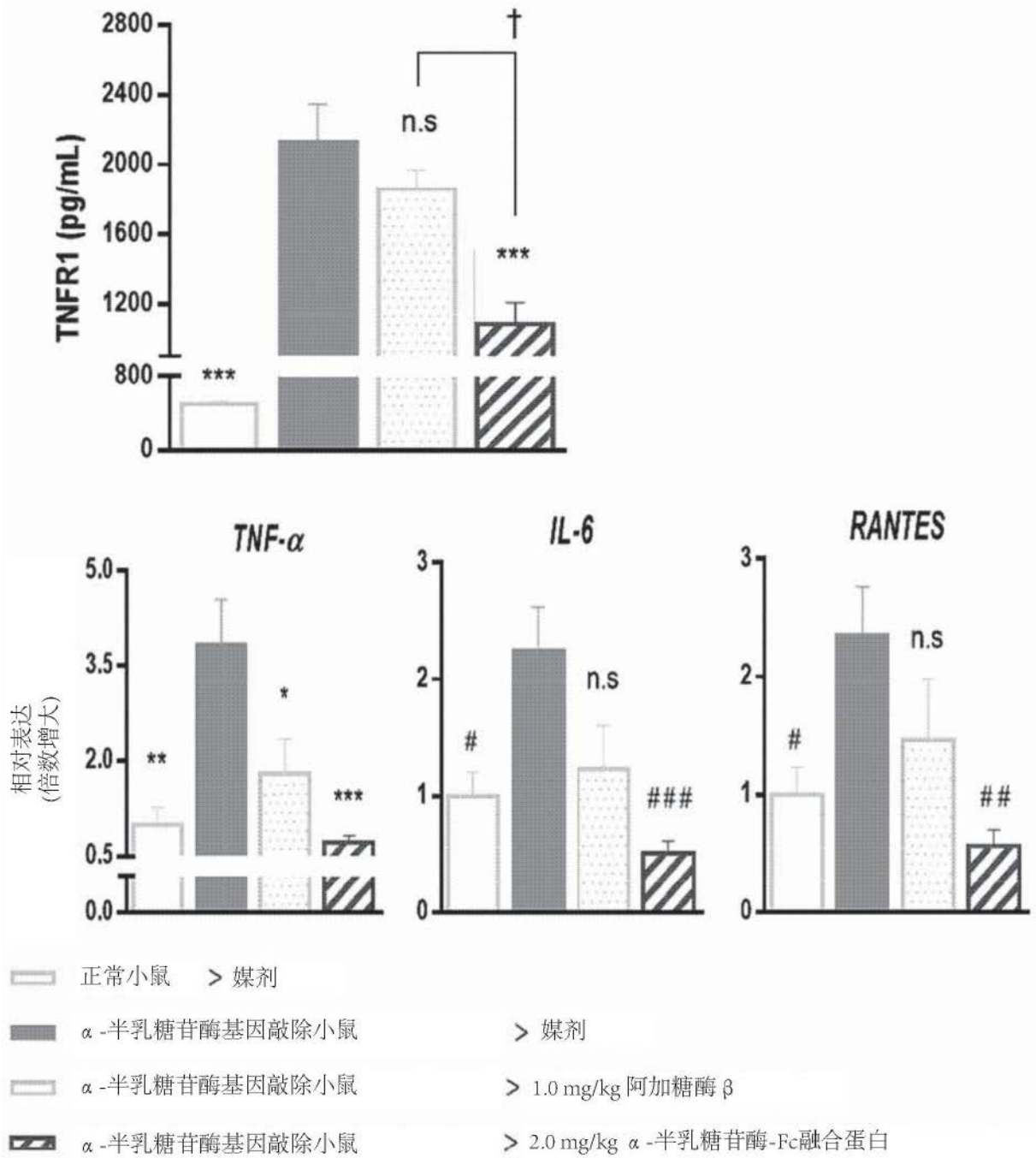


图3

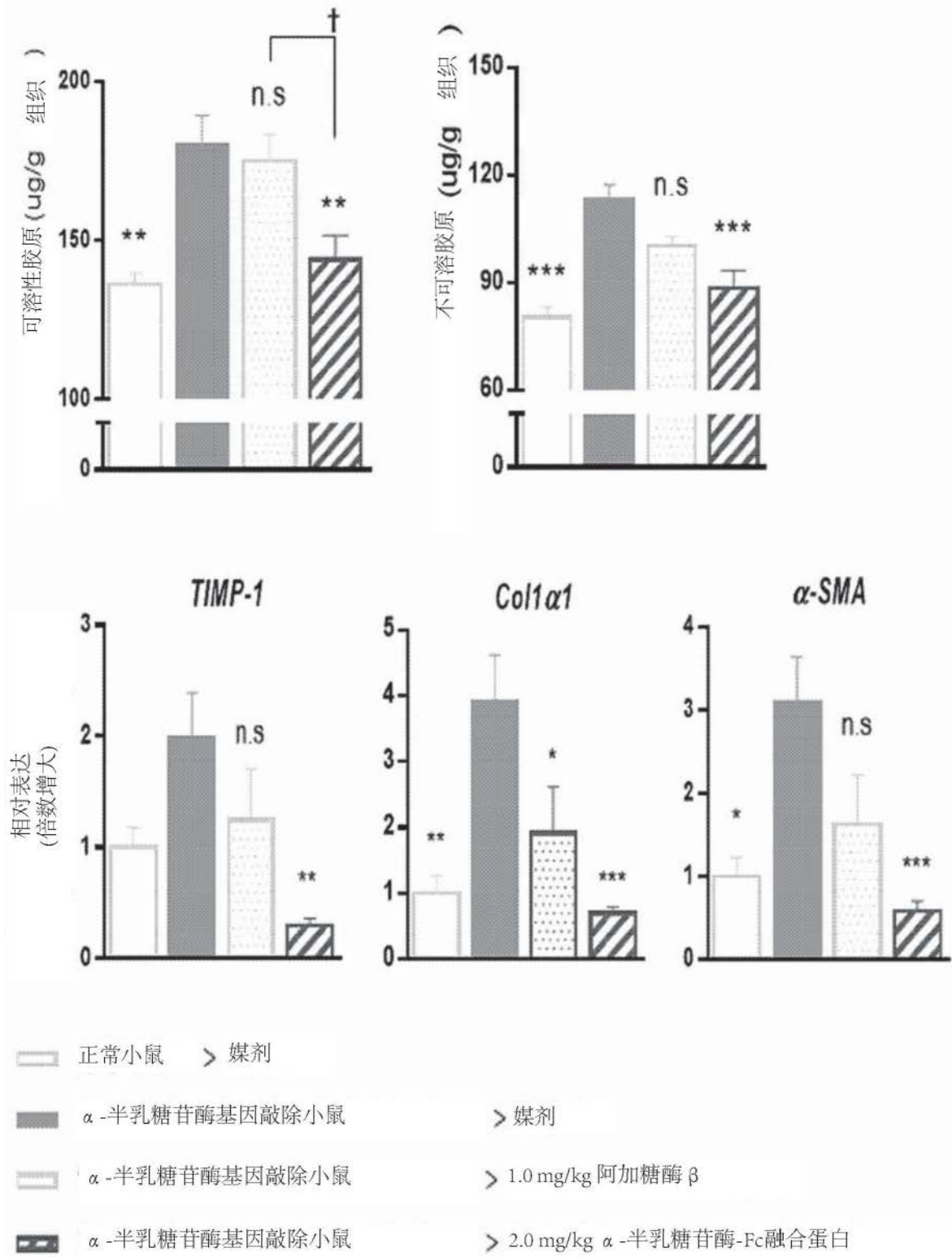


图4