



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121959** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 13826**

(22) Дата подання заявки: **28.06.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.08.2020**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **61/666,733**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **29.06.2012**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **27.04.2015, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.08.2020, Бюл.№ 16**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/US2013/048561,
28.06.2013**

(72) Винахідник(и):
Ніколс Дейв (US)

(73) Власник(и):
ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК ТЕРАПІС, ІНК.,
300 Shire Way, Lexington, Massachusetts
02421, United States of America (US)

(74) Представник:
Кістерський Кирило Арсенійович,
реєстр. №207

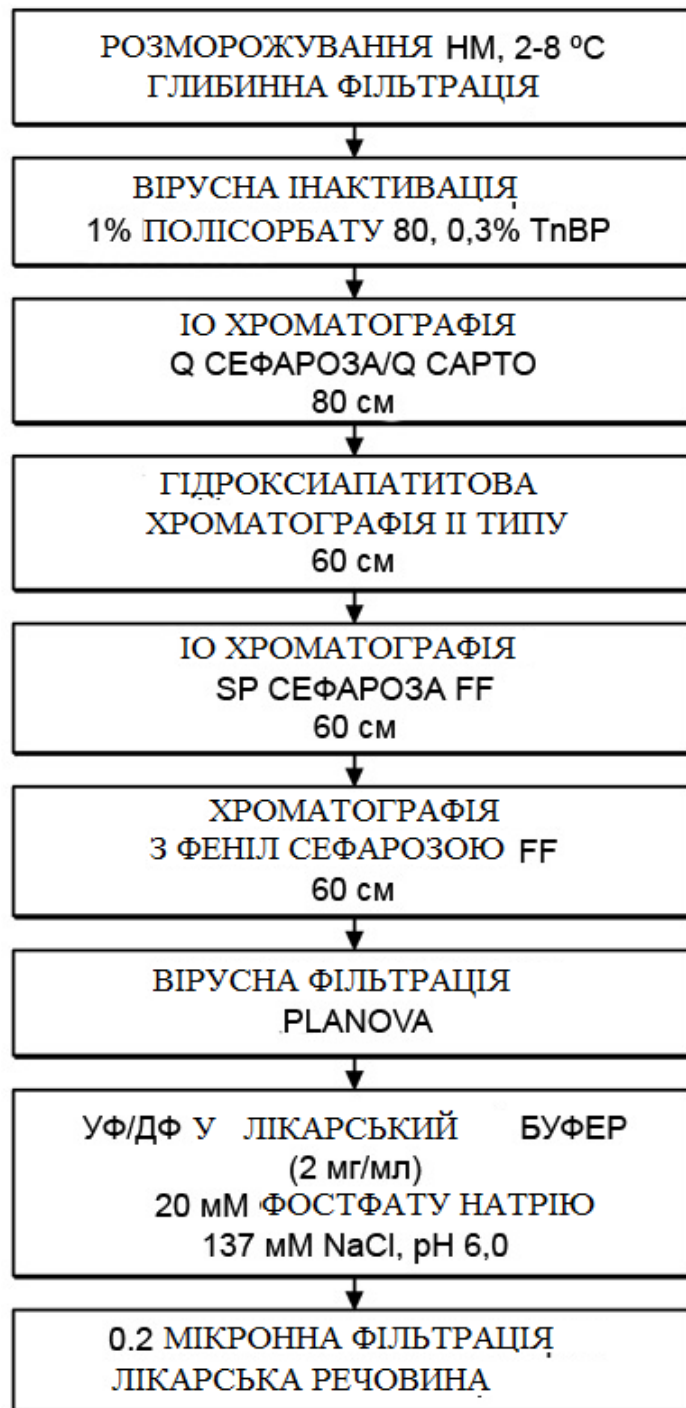
(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
WO 2012177020 A2, 26.08.2004
US 5728381 A, 17.03.1998
WO 2011044542 A1, 14.04.2011
Brain-Penetrating IgG-Iduronate 2-Sulfatase
Fusion Protein for the Mouse / Qing-Hui Zhou,
Ruben J. Boado, Jeff Zhiqiang Lu et. al. //
Drug metabolism and disposition. – 2012. -
Vol. 40 (2). - P. 329-335
WO 2004062592 A2, 29.07.2004
US 7541164 B2, 02.06.2009
US 6096555 A, 01.08.2000
US 8128925 B2, 06.03.2012
US 7323553 B2, 29.01.2008
A phase I/II clinical trial of enzyme
replacement therapy in mucopolysaccharidosis
II (Hunter syndrome) / Joseph Muenzer, Muge
Gucsavas-Calikoglu, Shawn E. McCandless
et. al. // Molecular Genetics and Metabolism. –
2007. - Vol. 90. - P. 329-337
Scientific Discussion. [Інтернет публікація],
URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000700/WC500023005.pdf

(54) СКЛАД, ЯКИЙ МІСТИТЬ ОЧИЩЕНУ РЕКОМБІНАНТНУ ІДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗУ (I2S)

(57) Реферат:

Винахід стосується складу, який містить очищену рекомбінантну ідуронат-2-сульфатазу (I2S), що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, при цьому очищена рекомбінантна I2S має щонайменше 70 % перетворення залишків цистеїну, що відповідають Cys59 із SEQ ID NO:1 у C α -формілгліцин (FGly), де очищена рекомбінантна I2S містить менше ніж 150 нг/мг білка клітини-хазяїна (БКХ).

UA 121959 C2



ФІГ.1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] Ця заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США 61/666733, поданою на реєстрацію 29 червня 2012 р., яка в повному обсязі включена в цей документ шляхом посилання.

5 Перелік послідовностей

[0002] Цей винахід посилається на Перелік послідовностей, поданий в електронній формі у вигляді файлу ASCII.txt під назвою "2006685-0342_SEQ_LIST" 27 червня 2013 р. Файл.txt був створений 25 червня 2013 р., його розмір становить 15 КБ. Повний зміст Переліку послідовностей включений в цей документ шляхом посилання.

10 Рівень техніки

[0003] Мукополісахаридоз II типу (МПС II, синдром Хантера) – це пов'язане з Х-хромосомою рецесивне захворювання з групи лізосомних хвороб накопичення, причиною якого є дефіцит ферменту ідуронат-2-сульфатази (I2S). I2S відщеплює термінальні 2-О-сульфатні компоненти від глікозаміногліканів (GAG) дерматансульфату та гепарансульфату. Внаслідок відсутності або

15 дефективності ферменту I2S у пацієнтів з синдромом Хантера GAG поступово накопичується в лізосомах різних типів клітин, що призводить до клітинного переповнення, органомегалії, руйнування тканин та систематичної дисфункції органів.

[0004] Зазвичай фізичні прояви синдрому Хантера у людей включають як соматичні, так і нейрональні симптоми. Наприклад, в деяких випадках синдрому Хантера ураження центральної нервової системи призводить до затримки в розвитку та проблем нервової системи. Хоча при народженні симптоми синдрому Хантера, не пов'язані з нервовою системою, зазвичай відсутні, з часом постійне накопичення GAG в клітинах тіла може сильно впливати на периферичні тканини тіла. Накопичення GAG в периферичній тканині призводить до характерної грубості рис обличчя пацієнта та обумовлює випираюче чоло, сплюснене перенісся та збільшений язик –

25 відмітні ознаки пацієнта з синдромом Хантера. Аналогічно, накопичення GAG може негативно впливати на системи органів тіла. Від початку виявляючись у вигляді потовщення стінок серця, легенів та дихальних шляхів, а також патологічного збільшення печінки, селезінки та нирок, ці кардинальні зміни можуть, кінець кінцем, призвести до загальної катастрофічної недостатності органів. Як наслідок, синдром Хантера завжди є важким, прогресуючим та обмежуючим час життя захворюванням.

[0005] Ферментозамісна терапія (ФЗТ) є схваленою терапією для лікування синдрому Хантера (МПС II), яка включає введення екзогенного замісного ферменту I2S пацієнтам з синдромом Хантера.

Суть винаходу

35 [0006] У цьому винаході, серед іншого, запропоновані вдосконалені способи очищення білка I2S, отриманого рекомбінантним способом, для ферментозамісної терапії. Цей винахід частково оснований на несподіваному відкритті, що рекомбінантний білок I2S може бути очищений з необроблених біологічних матеріалів, таких як клітинне культуральне середовище, що містить I2S, за допомогою способу, що включає застосування всього лише чотирьох хроматографічних колонок. Існуючий загальноприйнятий спосіб очищення рекомбінантного I2S для ферментозамісної терапії включає застосування 6 хроматографічних колонок. Як описано в розділі Прикладів, рекомбінантні білки I2S, очищені чотирьохколонковим способом згідно з винаходом, відповідають ринковим вимогам до ступеню очищення у США і багатьох інших країнах. До того ж, рекомбінантний фермент I2S, очищений відповідно до цього винаходу,

45 зберігає високий відсоток C α -формілгліцину (FGly) (наприклад, вище 70 % та аж до 100 %), що є важливим для активності ферменту I2S, і такі відмітні характеристики, як вміст сілової кислоти і карта гліканів, які можуть поліпшити біодоступність та/або лізосомне націлювання рекомбінантного білка I2S. Отже, в цьому винаході запропонований ефективний, менш витратний та більш швидкий спосіб очищення рекомбінантного білка I2S. Цей винахід є особливо

50 доцільним для очищення рекомбінантного білка I2S, що виробляється в безсироватковому середовищі.

[0007] Таким чином, в одному аспекті в цьому винаході запропонований спосіб очищення рекомбінантного білка I2S з неочищеного препарату за допомогою процесу, оснований на одному або більше способах з аніонообмінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, хроматографії з комбінованим режимом та хроматографії з гідрофобною взаємодією. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає менше 6 (наприклад, менше 5, менше 4 або менше 3) хроматографічних етапів. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає 2, 3, 4 або 5 хроматографічних етапів. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає 4 хроматографічних етапи. У деяких варіантах реалізації винаходу

очищений рекомбінантний білок I2Sзгідно з цим винаходом містить менше ніж 100 нг/мг білку клітини-хазяїна (БКХ) (наприклад, менше ніж 90 нг/мг БКХ, менше ніж 80 нг/мг БКХ, менше ніж 70 нг/мг БКХ, менше ніж 60 нг/мг БКХ, менше ніж 50 нг/мг БКХ, менше ніж 40 нг/мг БКХ, менше ніж 30 нг/мг БКХ, менше ніж 20 нг/мг БКХ, менше ніж 10 нг/мг БКХ).

[0008] У деяких варіантах реалізації винаходу придатним видом аніонообмінної хроматографії є Q хроматографія. У деяких варіантах реалізації винаходу придатним видом катіонообмінної хроматографії є SP хроматографія. У деяких варіантах реалізації винаходу придатним видом хроматографії з комбінованим режимом є гідроксиапатитова (НА) хроматографія. У деяких варіантах реалізації винаходу придатним видом хроматографії з гідрофобною взаємодією є хроматографія з фенілом.

[0009] Передбачається, що аніонообмінну хроматографію (наприклад, Q-колону), катіонообмінну хроматографію (наприклад, SP-колону), хроматографію з комбінованим режимом (наприклад, НА-колону) та хроматографію з гідрофобною взаємодією (наприклад, колону з фенілом) можна проводити в будь-якому порядку. У деяких варіантах реалізації винаходу способом згідно з цим винаходом включає проведення зазначених етапів у такому порядку: аніонообмінна хроматографія (наприклад, Q-колону), катіонообмінна хроматографія (наприклад, SP-колону), хроматографія з комбінованим режимом (наприклад, НА-колону) та хроматографія з гідрофобною взаємодією (наприклад, колону з фенілом).

[0010] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у аніонообмінну хроматографічну колону (наприклад, Q-колону) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до рівня рН, що становить приблизно 5,0-7,0 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 або 7,0), і провідності, що становить приблизно 10-20 мсм/см (наприклад, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 мсм/см). У деяких варіантах реалізації винаходу рН доводять, застосовуючи 1 М ацетат натрію. У деяких варіантах реалізації винаходу провідність доводять, застосовуючи 5 М хлорид натрію. У деяких варіантах реалізації винаходу аніонообмінну хроматографічну колону після завантаження промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 140 мм до 200 мм (наприклад, приблизно 140 мм, 145 мм, 150 мм, 155 мм, 160 мм, 165 мм, 170 мм, 175 мм, 180 мм, 185 мм, 190 мм, 195 мм або 200 мм) з рН, що становить приблизно 5,0-7,0 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 або 7,0). У деяких варіантах реалізації винаходу аніонообмінну хроматографічну колону елюють, застосовуючи елюючий буфер, який характеризується лінійним градієнтом солі (наприклад, NaCl). У деяких варіантах реалізації винаходу придатний лінійний градієнт NaCl характеризується діапазоном, що становить приблизно 0-500 мм NaCl (наприклад, приблизно 0-400 мм, приблизно 0-350 мм, приблизно 0-300 мм, приблизно 50-500 мм, приблизно 150-500 мм, приблизно 150-450 мм, приблизно 150-400 мм).

[0011] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у катіонообмінну хроматографічну колону (наприклад, SP-колону) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до провідності в діапазоні між приблизно 1 мсм/см та 20 мсм/см (наприклад, між приблизно 1 мсм/см та 15 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см та 10 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см та 8 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см та 6 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см та 4 мсм/см, між приблизно 2 мсм/см та 4 мсм/см). У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у катіонообмінну хроматографічну колону (наприклад, SP-колону) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до провідності в діапазоні між приблизно 2 мсм/см та 4 мсм/см (наприклад, 2, 2,5, 3, 3,5 або 4 мсм/см). У деяких варіантах реалізації винаходу значення провідності доводять, розводячи елюат з аніонообмінної хроматографічної колонки H₂O у співвідношенні, що становить приблизно 1-2:1 (наприклад, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 або 2:1). У деяких варіантах реалізації винаходу значення провідності доводять діалізацією. У деяких варіантах реалізації винаходу катіонообмінну хроматографію проводять на колонці при рівні рН, що становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5). У деяких варіантах реалізації винаходу катіонообмінну хроматографію проводять на колонці з буфером, що містить концентрацію фосфату (наприклад, NaPO₄) в діапазоні від приблизно 0,01 М до приблизно 0,1 М (наприклад, приблизно 0,01 М, 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М, 0,06 М, 0,07 М, 0,08 М, 0,09 М або 0,1 М). У деяких варіантах реалізації винаходу відповідний рівень рН становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5).

[0012] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у колону для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колону) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до концентрації фосфату (наприклад, NaPO₄) в діапазоні від приблизно 0,001 М до приблизно 0,01 М (наприклад, приблизно 0,001 М,

0,002 М, 0,003 М, 0,004 М, 0,005 М, 0,006 М, 0,007 М, 0,008 М, 0,009 М або 0,01 М) тарівня рН, що становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5). У деяких варіантах реалізації винаходу колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) після завантаження промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить фосфат (наприклад, 1-10 мм фосфат натрію або калію) з нейтральним або практично нейтральним рН. У деяких варіантах реалізації винаходу завантажену колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію фосфату в діапазоні, що становить приблизно 10-20 мм (наприклад, приблизно 10-18 мм, 10-16 мм, 10-15 мм, 12-20 мм, 14-18 мм, 14-16 мм). У деяких варіантах реалізації винаходу завантажену колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить фосфат в концентрації більшій, ніж 10 мм, 11 мм, 12 мм, 13 мм, 14 мм, 15 мм, 16 мм, 17 мм, 18 мм, 19 мм, 20 мм. У деяких варіантах реалізації винаходу елюювання з колонки для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонки) проводять за допомогою градієнтного фосфатного буферу. У деяких варіантах реалізації винаходу придатний елююючий буфер може характеризуватися фосфатним градієнтом, що становить приблизно 1-400 мм (наприклад, 1-300 мм, 1-200 мм, 1-150 мм, 1-100 мм, 10-350 мм, 10-300 мм, 10-250 мм, 10-200 мм, 10-150 мм, 10-140 мм, 10-130 мм, 10-120 мм, 10-110 мм, 10-100 мм, 10-90 мм, 10-80 мм, 10-70 мм, 10-60 мм, 10-50 мм) фосфату натрію або фосфату калію. У деяких варіантах реалізації винаходу елюювання з НА-колонки проводять за допомогою ступеневого підвищення концентрації фосфату в буфері для елюювання. У деяких варіантах реалізації винаходу ступінчасті буфери для елюювання можуть містити фосфат (наприклад, фосфат натрію) в концентрації, вибраної з 10 мм, 20 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм, 150 мм, 200 мм, 250 мм, 300 мм, 350 мм, 400 мм. У деяких варіантах реалізації винаходу елюювання з колонки для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонки) проводять за допомогою буферу для елюювання, що містить фосфат (наприклад, фосфат натрію) в концентрації в діапазоні від приблизно 50 мм до 150 мм (наприклад, вибраної з концентрацій фосфату (наприклад, фосфату натрію), що складаються 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм, 150 мм та їх комбінацій).

[0013] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією (наприклад, колонку з фенілом) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до концентрації солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,5 М до приблизно 2,0 М (наприклад, приблизно 0,5 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М або 2,0 М NaCl) та рівня рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0). У деяких варіантах реалізації винаходу колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією після завантаження промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,5 М до 2,0 М (наприклад, приблизно 0,5 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М або 2,0 М NaCl) при рівні рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0). У деяких варіантах реалізації винаходу колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією елюють, застосовуючи елююючий буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,1 М до приблизно 0,5 М (наприклад, приблизно 0,1 М, 0,2 М, 0,3 М, 0,4 М, або 0,5 М NaCl) при рівні рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0).

[0014] У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з колонок для аніонообмінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, хроматографії з комбінованим режимом та хроматографії з гідрофобною взаємодією має висоту в діапазоні, що становить 14-25 см (наприклад, 15-25 см, 15-20 см, 14-24 см, 14-22 см, 14-20 см або 16-18 см). У деяких варіантах реалізації винаходу кожна з колонок для аніонообмінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, хроматографії з комбінованим режимом та хроматографії з гідрофобною взаємодією має висоту, що становить приблизно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 см.

[0015] У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає етап вірусної інактивації перед завантаженням неочищеного препарату в першу хроматографічну колонку. У деяких варіантах реалізації винаходу етап вірусної інактивації включає додавання в неочищений препарат детергенту. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає етап вірусного видалення після останньої хроматографічної колонки. У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб згідно з винаходом додатково включає етап ультрафільтрації та/або діалізації.

деяких варіантах реалізації винаходу етап ультрафільтрації та/або діалізації включає переміщення очищеного рекомбінантного білка I2S в буфер лікарського препарату.

[0016] У деяких варіантах реалізації цей винахід застосовують для очищення рекомбінантного білка I2S, що має амінокислотну послідовність щонайменше на приблизно 50 % (наприклад, щонайменше на приблизно 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) ідентичну SEQIDNO:1. У деяких варіантах реалізації цей винахід застосовується для очищення рекомбінантного білка I2S, що має амінокислотну послідовність, ідентичну SEQIDNO:1.

[0017] У деяких варіантах реалізації цей винахід застосовують для очищення рекомбінантного білка I2S, що виробляється клітинами ссавців, культивованими у суспензії в безсироватковому середовищі. У деяких варіантах реалізації винаходу в безсироватковому середовищі, придатному для цілей винаходу, відсутні компоненти тваринного походження. У деяких варіантах реалізації винаходу безсироваткове середовище, придатне для цілей винаходу, є хімічно визначеним середовищем. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини ссавців культивують у біореакторі. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини ссавців коекспресують рекомбінантний білок I2S і формілгліцин-утворюючий фермент (FGE). У деяких варіантах реалізації винаходу клітини ссавців є клітинами людини.

[0018] У деяких варіантах реалізації винаходу неочищений препарат, що застосовується в способі згідно з винаходом, отримують з безсироваткового середовища, що містить рекомбінантний білок I2S, який секретується з клітин ссавців. У деяких варіантах реалізації винаходу неочищений препарат, що застосовується в способі згідно з винаходом, одержують, розморожуючи заморожений препарат середовища.

[0019] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом в середньому містить 16-22 (наприклад, 16-21, 16-20, 16-19, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19) сілових кислот на молекулу. У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом в середньому містить 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 сілових кислот на молекулу.

[0020] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом містить щонайменше приблизно 70 % (наприклад, щонайменше приблизно 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) залишків цистеїну, які відповідають Cys59 людського I2S (SEQIDNO:1), перетворених у C α -формілгліцин (FGly). У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом містить практично 100 % залишків цистеїну, які відповідають Cys59 людського I2S (SEQIDNO:1), перетворених у C α -формілгліцин (FGly). У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом характеризується специфічною активністю, яка становить щонайменше приблизно 20 Од/мг, 30 Од/мг, 40 Од/мг, 50 Од/мг, 60 Од/мг, 70 Од/мг, 80 Од/мг, 90 Од/мг або 100 Од/мг, визначеної за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду.

[0021] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом характеризується клітинним поглинанням, що становить більше ніж 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, визначеним за допомогою *in vitro* аналізу поглинання.

[0022] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом характеризується картою гліканів, що містить групи з семи піків, які відповідають нейтральному (група піків 1), моносіалованому (група піків 2), дисіалованому (група піків 3), монофосфорильованому (група піків 4), трисіалованому (група піків 5), тетрасіалованому (група піків 6) та дифосфорильованому (група піків 7) білку I2S, відповідно. У деяких варіантах реалізації винаходу карта гліканів отримана після розщеплення нейрамінідазою. В інших варіантах реалізації винаходу карта гліканів отримана після розщеплення лужною фосфатазою.

[0023] Серед іншого, в цьому винаході запропонований очищений рекомбінантний білок I2S, описаний в цьому документі, та фармацевтична композиції або препарати, що їх містять. У деяких варіантах реалізації винаходу препарат виготовлений для внутрішньовенного, підшкірного та/або інтратекального введення. У цьому винаході також запропоновані способи лікування синдрому Хантера шляхом введення суб'єкту, який потребує лікування, очищеного рекомбінантного білку I2S, фармацевтичної композиції або препарату, що його містить.

[0024] Терміни "білок I2S", "I2S", "фермент I2S", які використовуються в цьому документі, або їх граматичні еквіваленти належать до одержання молекул рекомбінантного білку I2S, якщо не вказане інше.

[0025] Терміни "приблизно" та "близько", які використовуються в цій заявці, застосовуються як еквівалентні. Мається на увазі, що будь-які чисельні значення, наведені в цій заявці з або без

приблизно/близько, включають будь-які нормальні відхилення, очевидні для фахівця у відповідній галузі техніки.

[0026] Інші ознаки, об'єкти та переваги цього винаходу стануть зрозумілими з нижченаведеного детального опису винаходу. При цьому варто розуміти, що детальний опис, хоча і вказує варіанти реалізації цього винаходу, наведений виключно з ілюстративною, але не обмежуючою метою. Для фахівців в цій галузі техніки різні зміни та модифікації, які входять в об'єм винаходу, стануть зрозумілими з детального опису.

Короткий опис графічних матеріалів

[0027] Описані нижче Фігури, які є Графічними матеріалами, наведені виключно з ілюстративною, але не обмежуючою метою.

[0028] На Фігурі 1 проілюстрована типова схема очищення рекомбінантного I2S, що виробляється в безсироватковому середовищі.

[0029] На Фігурі 2 проілюстровані типові пептидні карти очищеного рекомбінантного I2S AF у порівнянні з контрольним I2S.

[0030] На Фігурі 3 проілюстрований типовий ДСН-ПААГ-аналіз (зі сріблом) очищеного рекомбінантного I2S AF.

[0031] На Фігурі 4 проілюстрований типовий аналіз профілю заряду очищеного рекомбінантного I2S AF за допомогою іонообмінної хроматографії.

[0032] На Фігурі 5 проілюстровані типові профілі карт гліканів очищеного рекомбінантного I2S AF.

[0033] На Фігурі 6 проілюстрований типовий аналіз активності (Од/мг) після етапу вірусної інактивації НМ освітленого збору рекомбінантного I2S.

[0034] На Фігурі 7 проілюстрований типовий аналіз EX-BEPX після етапу вірусної інактивації НМ освітленого збору рекомбінантного I2S.

[0035] На Фігурі 8 проілюстрований типовий ДСН-ПААГ з обробкою срібним барвником очищеного рекомбінантного білка I2S.

[0036] На Фігурі 9 проілюстрована типова пептидна карта для очищеного рекомбінантного ферменту I2S, що виробляється клітинної лінією I2S-AF 2D, яка вирощується у безсироваткових умовах культивування (верхня панель), у порівнянні з контролем.

[0037] На Фігурі 10 проілюстровані типові профілі гліканів, отримані для очищених рекомбінантних ферментів I2S, що виробляються клітинними лініями I2S-AF 2D та 4D, які вирощуються у безсироваткових умовах культивування, порівняно з контролем.

[0038] На Фігурі 11 проілюстрований типовий профіль заряду для очищеного рекомбінантного ферменту I2S, що виробляється клітинної лінією I2S-AF 2D, яка вирощується у безсироваткових умовах культивування, порівняно з контролем.

Визначення

[0039] Для кращого розуміння цього винаходу нижче наведені визначення деяких термінів. Додаткові визначення для нижченаведених термінів та інших термінів, наведені в продовження всього опису винаходу.

[0040] Приблизно або близько. Термін "приблизно" або "близько", який використовується в цьому документі, застосовується відносно однієї або більше величин, які становлять інтерес, позначає величину, яка є схожою із зазначеною заданою величиною. У певних варіантах реалізації винаходу термін "приблизно" або "близько" належить до діапазону величин, який потрапляє в межі 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % або менше в обидва боки (більше ніж або менше ніж) від зазначеної заданої величини, якщо не вказане інше або інше не очевидне з контексту (за винятком випадку, коли таке число перевищувало б 100 % від можливої величини).

[0041] Біологічно активний: Фраза "біологічно активний", яка використовується в цьому документі, належить до характеристики будь-якої речовини, яка має активність в біологічній системі (наприклад, клітинній культурі, організмі і так далі). Наприклад, речовина, яка при введенні в організм чинить на цей організм біологічний ефект, вважається біологічно активною. Біологічну активність також можна визначити за допомогою методів *in vitro* аналізу (наприклад, *in vitro* ферментного аналізу, такого як аналіз вивільнення сульфату). У конкретних варіантах реалізації винаходу якщо білок або поліпептид є біологічно активним, частина цього білку або поліпептиду, яка має щонайменше один вид біологічної активності білку або поліпептиду, зазвичай називають "біологічно активною" частиною. У деяких варіантах реалізації винаходу білок отримують та/або очищують від клітинної культуральної системи, яка проявляє біологічну активність за введення суб'єктові. У деяких варіантах реалізації винаходу білок потребує додаткового процесингу для того, щоб стати біологічно активним. У деяких варіантах реалізації винаходу білок, для того, щоб стати біологічно активним, потребує посттрансляційних

модифікацій, таких як, без обмежень, глікозилювання (наприклад, сіалювання), фарнезилювання, розщеплювання, фолдинг, конверсія у формілгліцин та комбінації переліченого вище. У деяких варіантах реалізації винаходу білок, отриманий у вигляді проформи (тобто, незрілої форми), може потребувати додаткової модифікації для того, щоб стати біологічно активним.

[0042] Катіон-незалежний рецептор манозо-6-фосфату (CI-MPR). Термін "катіон-незалежний рецептор манозо-6-фосфату (CI-MPR)", який використовується в цьому документі, належить до клітинного рецептору, що зв'язує манозо-6-фосфатні (M6P) мітки попередника кислотої гідролази в апараті Гольджі, які відповідають за транспорт у лізосоми. Крім манозо-6-фосфатів CI-MPR також зв'язує інші білки, включаючи IGF-II. CI-MPR відомий також під назвами "M6P/IGF-II рецептора", "CI-MPR/IGF-II рецептора", "IGF-II рецептора" або "IGF2 рецептора". Ці терміни та їхні аббревіатури використовуються в цьому документі взаємозамінно.

[0043] Хроматографія. Термін "хроматографія", який використовується в цьому документі, належить до способу розділення сумішей. Як правило, суміш розчиняють в рідині, яканазивається "рухомою фазою", за допомогою якої її проводять через структуру, що містить іншу речовину, яканазивається "стаціонарною фазою". Колонкова хроматографія являє собою спосіб розділення, в якому нерухомий шар знаходиться в трубці, тобто, колонці.

[0044] Розріджувач. Термін "розріджувач", який використовується в цьому документі, належить до фармацевтично прийнятної (наприклад, безпечної та нетоксичної для застосування на людях) речовини для розрідження, яка застосовується для одержання відновленого препарату. Типові розріджувачі включають стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (БВДІ), рН буферні розчини (наприклад, фосфатно-сольовий буферний розчин), стерильний сольовий розчин, розчин Рінгера або розчин декстрази.

[0045] Елюювання. Термін "елюювання", який використовується в цьому документі, належить до процесу екстракції однієї речовини з іншої шляхом промивання розчином. Наприклад, в іонообмінній хроматографії елюювання - це процес, призначений для промивання завантажених смол для видалення захоплених іонів.

[0046] Елюат. Термін "елюат", який використовується в цьому документі, належить до комбінації "носія" рухомої фази та аналізованого матеріалу, який виявляють в результаті хроматографії, як правило, в результаті елюювання.

[0047] Ферментозамісна терапія (ФЗТ): Термін "ферментозамісна терапія (ФЗТ)", який використовується в цьому документі, належить до будь-якої терапевтичної стратегії, яка ліквідує дефіцит ферментів за допомогою введення необхідних ферментів. Після введення фермент захоплюється клітинами та транспортується у лізосому, де фермент діє так, щоб знищити матеріал, який накопичився у лізосомах внаслідок дефіциту ферментів. Як правило, для того, щоб лізосомна ферментозамісна терапія була ефективною, терапевтичний фермент доставляють у лізосоми відповідних клітин тканин-мішеней, в яких виявляється дефект накопичення.

[0048] Врівноважувати або врівноваження. Терміни "врівноважувати" та "врівноваження", які використовуються в цьому документі стосовно хроматографії, належать до процесу наведення першої рідини (наприклад, буфера) в баланс з іншою, в загальному випадку для того, щоб досягти стабільного та однакового розділення компонентів рідини (наприклад, буферу). Наприклад, в деяких варіантах реалізації винаходу хроматографічну колонку можна врівноважити за допомогою пропускання одного або більше об'ємів необхідної рідини (наприклад, буферу) через колонку.

[0049] Покращуватися, підвищуватися або знижуватися. Під час використання в цьому документі за допомогою термінів "покращуватися", "підвищуватися" або "знижуватися" або їхніх граматичних еквівалентів, оцінюють величини відносно базового вимірювання, такого як вимірювання, проведене для однієї й тієї ж особи до початку лікування, описаного в цьому документі, або вимірювання, проведене для контрольної особи (або декількох контрольних осіб) у відсутності лікування, описаного в цьому документі. "Контрольною особою" є особа, уражена тією самою формою лізосомної хвороби накопичення, що й особа, яка проходить лікування, приблизно того самого віку, що й особа, яка проходить лікування, (для гарантії того, що стадії захворювання у особи, яка проходить лікування, та контрольної(их) особи(іб) можна порівняти).

[0050] Домішки. Термін "домішки", який використовується в цьому документі, належить до речовин, що знаходяться в обмеженому об'ємі рідини, газу або твердого тіла, які відрізняються за хімічною композицією від цільової речовини або сполуки. Домішки називають також забруднюючими речовинами.

[0051] Лінкер. Термін "лінкер", який використовується в цьому документі щодо розлитого білка, належить до амінокислотної послідовності, відмінної від тієї, яка знаходиться в даній конкретній

позиції в природному білку, і в загальному випадку сконструйований гнучким або з можливістю розміщення його в структуру, як, наприклад, а-спіраль між двома білковими компонентами. Лінкер також називають спейсером.

[0052] Завантаження. Термін "завантаження", який використовується в цьому документі в випадку хроматографії, належить до додавання рідини, що містить зразки, або твердофазної речовини у колонку. У деяких варіантах реалізації винаходу конкретні компоненти зразка, який завантажується у колонку, згодом захоплюються при проходженні завантаженого зразка через колонку. У деяких варіантах реалізації винаходу конкретні компоненти зразка, який завантажується у колонку, не захоплюються або "протікають через" колонку при проходженні завантаженого зразка через колонку.

[0053] Поліпептид. У контексті цього документу "поліпептид" в загальному випадку являє собою ланцюг із щонайменше двох амінокислот, з'єднаних одна з одною пептидним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид може містити щонайменше 3-5 амінокислот, кожна з яких з'єднана з іншими за допомогою щонайменше одного пептидного зв'язку. Фахівцям у цій галузі техніки зрозуміло, що іноді поліпептиди включають амінокислоти "неприродного походження" або інші сполуки, які здатні інтегруватися в поліпептидний ланцюг.

[0054] Об'єднання. Термін "об'єднання", який використовується в цьому документі щодо хроматографії, належить до об'єднання однієї або більше фракцій рідини, які пройшли через колонку. Наприклад, в деяких варіантах реалізації винаходу одну або більше фракцій, що містять необхідний компонент зразка, який був відокремлений за допомогою хроматографії (наприклад, "пікові фракції"), можна "об'єднувати" разом для отримання єдиної "об'єднаної" фракції.

[0055] Замісний фермент. Термін "замісний фермент", який використовується в цьому документі, належить до будь-якого ферменту, який може діяти таким чином, щоб щонайменше частково замінити дефіцитний або відсутній фермент при захворюванні, лікування якого проводиться. У деяких варіантах реалізації винаходу термін "замісний фермент" належить до будь-якого ферменту, який може діяти так, щоб щонайменше частково замінити дефіцитний або відсутній лізосомний фермент за лізосомної хвороби накопичення, лікування якої проводиться. У деяких варіантах реалізації винаходу замісний фермент здатний знижувати кількість накопиченого матеріалу в лізосомах ссавців або може знімати або полегшувати один або більше симптомів лізосомної хвороби накопичення. Замісні ферменти, придатні для винаходу, включають лізосомні ферменти як дикого типу, так і модифіковані, і можуть бути одержані за допомогою рекомбінантних та синтетичних способів або очищені з природних джерел. Замісний фермент може бути рекомбінантним, синтетичним, таким, що генно-активується, або природним ферментом.

[0056] Розчинний. Термін "розчинний", який використовується в цьому документі, належить до здатності терапевтичної речовини утворювати гомогенний розчин. У деяких варіантах реалізації винаходу розчинність терапевтичної речовини в розчині, в який вона вводиться за допомогою якого вона доставляється до цільової ділянки дії, достатня для того, щоб зробити можливою доставку терапевтично ефективної кількості терапевтичної речовини до цільової ділянки дії. На розчинність терапевтичних речовин можуть впливати кілька факторів. Наприклад, фактори, які можуть впливати на розчинність білка, включають іонну силу, амінокислотну послідовність та наявність інших спільно розчинних речовин або солей (наприклад, солей кальцію). У деяких варіантах реалізації винаходу терапевтичні речовини згідно з цим винаходом розчиняються у відповідних фармацевтичних композиціях.

[0057] Стабільність. Термін "стабільність", який використовується в цьому документі, належить до здатності терапевтичної речовини (наприклад, рекомбінантного ферменту) зберігати терапевтичну ефективність (наприклад, всю або більшу частину своєї очікуваної біологічної активності та/або фізіохімічної функції) на протязі тривалих періодів часу. Стабільність терапевтичної речовини і здатність фармацевтичної композиції підтримувати стабільність такої терапевтичної речовини може бути досягнута на протязі тривалих періодів часу (наприклад, на протязі щонайменше 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 місяців або більше). У контексті виготовлення препаратів стабільним препаратом є такий, у якому терапевтична речовина зберігає свої фізичні та/або хімічні функції та біологічну активність за зберігання під час обробки (наприклад, заморожування/розморожування, механічного змішування та ліофілізації). Стабільність білків можна визначити за утворенням високомолекулярних (ВМ) агрегатів, втратою ферментативної активності, утворенням пептидних фрагментів та зсуву профілів заряду.

[0058] Вірусна обробка. Термін "вірусна обробка", який використовується в цьому документі, належить до "вірусного видалення", під час якого віруси просто видаляють із зразка, або

"вірусної інактивації", під час якої віруси залишаються у зразку, але в неактивній формі. У деяких варіантах реалізації винаходу для вірусного видалення, серед іншого, можна застосовувати нанофільтрацію та/або хроматографічні методи. У деяких варіантах реалізації винаходу для вірусної інактивації, серед іншого, можна застосовувати інактивацію розчином, інактивацію детергентом, пастеризацію, інактивацію кислотним рН та/або інактивацію ультрафіолетом.

Детальний опис винаходу

[0059] У цьому винаході, серед іншого, запропонований спосіб очищення рекомбінантного білка I2S для ферментозамісної терапії на основі процесу, що включає менше 6 хроматографічних етапів. У деяких варіантах реалізації винаходу в цьому винаході запропонований спосіб очищення рекомбінантного білка I2S з неочищеного препарату за допомогою процесу на основі одного або більше способів з аніонообмінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, хроматографії з комбінованим режимом та хроматографії з гідрофобною взаємодією. У деяких варіантах реалізації винаходу в цьому винаході запропонований спосіб очищення рекомбінантного білка I2S з неочищеного препарату за допомогою Q хроматографії, гідроксиапатитової (HA) хроматографії, SP хроматографії та хроматографії з фенілом. У цьому винаході додатково запропонований очищений рекомбінантний білок I2S та спосіб його застосування.

[0060] Різні аспекти винаходу детально описані в нижченаведених підрозділах. Використання підрозділів не обмежує винахід. Кожний підрозділ можна застосовувати до будь-якого аспекту винаходу. У цій заявці використання "або" позначає "та/або", якщо не вказане інше.

Рекомбінантний білок I2S

[0061] Під час використання в цьому документі білок I2S є будь-яким білком або частиною білку, який може щонайменше частково замінити активність білку ідуронат-2-сульфатази (I2S) природного походження або зняти одне або більше клінічних проявів або симптомів, пов'язаних з дефіцитом I2S. Терміни "фермент I2S" та "білок I2S", які використовуються в цьому документі, та їх граматичні еквіваленти використовуються взаємозамінно.

[0062] Як правило, людський білок I2S виробляється у формі попередника. Форма попередника людського I2S містить сигнальний пептид (амінокислотні залишки 1-25 повнорозмірного попередника), пропептид (амінокислотні залишки 26-33 повнорозмірного попередника) та ланцюг (залишки 34-550 повнорозмірного попередника), який може бути додатково процесованим у 42 кДа ланцюг (залишки 34-455 повнорозмірного попередника) і 14 кДа ланцюг (залишки 446-550 повнорозмірного попередника). Зазвичай форму попередника називають також повнорозмірним попередником або повнорозмірним білком I2S, який містить 550 амінокислот. Амінокислотні послідовності зрілої форми (SEQ ID NO:1) з видаленим сигнальним пептидом та повнорозмірний попередник (SEQ ID NO:2) типового білку I2S дикого типу або природного походження наведені в Таблиці 1. Сигнальний пептид виділений підкресленням. Додатково, в Таблиці 1 також наведені амінокислотні послідовності ізоформ а та b попередника людського білку I2S, SEQ ID NO:3 та 4, відповідно.

Таблиця 1

Людська ідуонат-2-сульфатаза

Зріла форма	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDCLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDSDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAQIQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVPDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRITASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:1)
Повнорозмірний попередник (ізоформа а)	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDCLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDSDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAQIQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVPDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRITASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:2)
Попередник, ізоформа b	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDCLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDSDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAQIQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVPDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGF LMRTNT (SEQ ID NO:3)
Попередник, ізоформа c	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDCLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDSDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAQIQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVPDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGF LMRTNT (SEQ ID NO:4)

[0063] Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є зрілим людським білком I2S (SEQIDNO:1). Як розкрито в цьому документі, SEQIDNO:1 являє собою канонічну амінокислотну послідовність людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу білок I2S може являти собою сплайс-ізоформу та/або варіант SEQIDNO:1, які утворюються в результаті транскрипції на іншій ділянці ініціації в межах 5' UTR гену I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S може бути гомологом або аналогом зрілого людського білку I2S. Наприклад, гомолог або аналог зрілого людського білку I2S може бути модифікованим зрілим людським білком I2S, що містить одну або більше амінокислотних замін, делецій та/або інсерцій в порівнянні з білком I2S дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:1), та при цьому зберігати значну частину активності білку I2S. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі гомологічним зрілому людському білку I2S (SEQ ID NO:1). У деяких

варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше гомологічну SEQ ID NO:1. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі ідентичним зрілому людському білку I2S (SEQ ID NO:1). У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну SEQ ID NO:1. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить фрагмент або частину зрілого людського білку I2S.

[0064] В альтернативному варіанті рекомбінантний білок I2S є повнорозмірним білком I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S може бути гомологом або аналогом повнорозмірного людського білку I2S. Наприклад, гомолог або аналог повнорозмірного людського білку I2S може бути модифікованим повнорозмірним людським білком I2S, що містить одну або більше амінокислотних замінів, делецій та/або інсерцій в порівнянні з повнорозмірним білком I2S дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:2), і при цьому зберігати значну частину активності білку I2S. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі гомологічним повнорозмірному людському білку I2S (SEQ ID NO:2). Наприклад, рекомбінантний білок I2S може містити амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше гомологічну SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі ідентичним SEQ ID NO:2. Наприклад, рекомбінантний білок I2S може містити амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну SEQ ID NO:2. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить фрагмент або частину повнорозмірного людського білка I2S. У контексті цього документу повнорозмірний білок I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

[0065] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є ізоформою а людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S може бути гомологом або аналогом ізоформи а людського білку I2S. Наприклад, гомолог або аналог ізоформи а людського білку I2S може бути модифікованою ізоформою а людського білку I2S, що містить одну або більше амінокислотних замінів, делецій та/або інсерцій у порівнянні з ізоформою а людського білку I2S дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:3), і при цьому зберігати значну частину активності білку I2S. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі гомологічною ізоформою а людського білку I2S (SEQ ID NO:3). Наприклад, рекомбінантний білок I2S може містити амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше гомологічну SEQ ID NO:3. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі ідентичним SEQ ID NO:3. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну SEQ ID NO:3. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину ізоформи а людського білку I2S. У контексті цього документу ізоформа а людського білку I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

[0066] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є ізоформою b людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S може бути гомологом або аналогом ізоформи b людського білку I2S. Наприклад, гомолог або аналог ізоформи b людського білку I2S може бути модифікованою ізоформою b людського білку I2S, що містить одну або більше амінокислотних замінів, делецій та/або інсерцій в порівнянні з ізоформою b людського білку I2S дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:4), і при цьому зберігати значну частину активності білку I2S. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S є в значній мірі гомологічним ізоформі b людського білку I2S (SEQ ID NO:4). Наприклад, рекомбінантний білок I2S може містити амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше гомологічну SEQ ID NO:4. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S є в значній мірі ідентичним SEQ ID NO:4. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S містить амінокислотну послідовність щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше ідентичну SEQ ID NO:4. У деяких варіантах реалізації

винаходу рекомбінантний білок I2S містить фрагмент або частину ізоформи b людського білку I2S. У контексті цього документу ізоформа b людського білку I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

[0067] Гомологи або аналоги людських білків I2S можна отримати відповідно до способів зміни поліпептидної послідовності, відомих фахівцеві в цій галузі техніки, такими як ті, що можна знайти в посиланнях, які описують подібні способи. У деяких варіантах реалізації винаходу консервативні амінокислотні заміни включають заміни, що проводяться для амінокислот в межах наступних груп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; та (g) E, D. У деяких варіантах реалізації винаходу "консервативна амінокислотна заміна" належить до амінокислотної заміни, яка не призводить до зміни відносного заряду або характерних розмірів білку, в якому проводиться амінокислотна заміна.

[0068] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантні білки I2S містять компонент, який зв'язується з рецептором на поверхні клітин-мішеней для того, щоб полегшити клітинне поглинання та/або лізосомне націлювання. Наприклад, таким рецептором може бути катіон-незалежний манозо-6-фосфатний рецептор (CI-MPR), який зв'язує залишки манозо-6-фосфату (M6P). Додатково, CI-MPR також зв'язує інші білки, включаючи IGF-II. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S містить залишки M6P на поверхні білка. Зокрема, рекомбінантний білок I2S може містити біс-фосфорильовані олігосахариди, які характеризуються більш високою афінністю зв'язування з CI-MPR. У деяких варіантах реалізації винаходу придатний фермент в середньому містить до приблизно 20 % біс-фосфорильованих олігосахаридів на фермент. В інших варіантах реалізації винаходу придатний фермент може містити приблизно 10 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % біс-фосфорильованих олігосахаридів на фермент.

[0069] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантні ферменти I2S можуть бути зшиті з компонентом для лізосомного націлювання, який здатний зв'язуватися з рецептором на поверхні клітин-мішеней. Компонентом, придатним для лізосомного націлювання, може бути IGF-I, IGF-II, RAP, p97, а також їхні варіанти, гомологи або фрагменти (наприклад, включаючи ті пептиди, що містять послідовність, щонайменше на 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичну пептидним послідовностям зрілих людських IGF-I, IGF-II, RAP, p97 дикого типу). Компонент для лізосомного націлювання може бути кон'югованим або зшитим з білком або ферментом I2Sy N-кінці, C-кінці або з внутрішньої сторони.

Одержання рекомбінантних білків I2S

[0070] Цей винахід можна застосовувати для очищення рекомбінантного білку I2S, одержаного різними способами. Наприклад, білок I2S може бути одержаний рекомбінантним способом за допомогою системи клітин-хазяїв, сконструйованих для експресії нуклеїнової кислоти, кодуєчої I2S. В альтернативному варіанті білок I2S може бути одержаний шляхом активації ендогенного гену I2S.

[0071] Передбачається, що цей винахід можна застосовувати для очищення рекомбінантного білку I2S, отриманого за допомогою різних експресійних систем. Придатні експресійні системи включають, наприклад, яйцеклітини, клітини бакуловірусів, рослин, дріжджів або ссавців.

[0072] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантні ферменти I2S виробляються в клітинах ссавців. Необмежуючі приклади клітин ссавців, які можна застосовувати відповідно до цього винаходу, включають лінію мієломи мишей штаму BALB/c (NSO/I, ECACC No:85110503); ретинобласти людини (PER.C6 (CruCell, Leiden, The Netherlands)); ниркову лінію мавп CV1, трансформовану SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); ембріональну ниркову лінію людини (клітини 293 або 293, субклоновані для вирощування в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); клітинну лінію фібросаркоми людини (наприклад, HT1080); клітини нирок новонародженого хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчників китайського хом'яка +/- DHFR (CHO, Urlaub And Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); клітини Сертолїмиші (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HeLa, ATCC CCL 2); клітини нирок собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки сирогощура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легень людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); пухлина молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL 51); клітини TRI (Mather et al., Annals NY Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; клітини гепатоми людини (Hep G2).

[0073] У деяких варіантах реалізації винаходу зазначені способи згідно з цим винаходом застосовують для очищення рекомбінантних ферментів I2S, отриманих з клітин людини (наприклад, HT1080). У деяких варіантах реалізації винаходу зазначені способи згідно з цим

винаходом застосовують для очищення рекомбінантних ферментів I2S, одержаних з клітин CHO.

[0074] Як правило, клітини, які сконструйовані для експресії рекомбінантного I2S, можуть містити трансген, кодуєчий описаний в цьому документі рекомбінантний білок I2S. Слід враховувати, що нуклеїнові кислоти, кодуєчі рекомбінантний I2S можуть містити регуляторні послідовності, регуляторні послідовності генів, промотори, некодуєчі послідовності та/або інші придатні послідовності для експресії рекомбінантного I2S. Як правило, кодуєча область функціонально зв'язана з одним або більше з цих компонентів нуклеїнової кислоти.

[0075] "Регуляторні послідовності", як правило, належать до нуклеотидних послідовностей, розташованих вище (5'некодуєчі послідовності), в межах або нижче (3'некодуєчі послідовності) кодуєчої послідовності, які впливають на транскрипцію, процесинг або стабільність РНК або трансляцію асоційованої з нею кодуєчої послідовності. Регуляторні послідовності можуть включати промотори, трансляційні лідерні послідовності, інтрони та послідовності впізнання поліаденілювання. У деяких випадках "регуляторні послідовності" також називають "регуляторними послідовностями генів".

[0076] "Промотором" зазвичай називають нуклеотидну послідовність, здатну управляти експресією кодуєчої послідовності або функціональної РНК. У загальному випадку кодуєча послідовність розташована у напрямку 3'відносно послідовності промотора. Послідовність промотора складається з близькорозташованих та більш віддалених вищерозташованих елементів, при цьому останні часто називають енхансерами. Відповідно, "енхансер" являє собою нуклеотидну послідовність, яка може стимулювати активність промотору та може бути природним елементом промотору або гетерологічним елементом, доданим для того, щоб підвищити рівень або тканинну специфічність промотору. Промотори можуть бути цілком одержані з нативного гену або можуть бути складені з різних елементів, одержаних з різних промоторів природного походження, або навіть містити синтетичні нуклеотидні сегменти. Фахівцям у цій галузі техніки зрозуміло, що різні промотори можуть управляти експресією гену в різних тканинах або типах клітин, або на різних стадіях розвитку, або у відповідь на різні зовнішні умови.

[0077] "3'некодуєчими послідовностями" зазвичай називаються нуклеотидні послідовності, які розташовані нижче кодуєчої послідовності, і включають послідовності впізнання поліаденілювання та інші послідовності, кодуєчі регуляторні сигнали, здатні впливати на процесинг мРНК або експресію генів. Сигнал поліаденілювання зазвичай характеризується впливом на додавання трактів поліаденілової кислоти до 3'кінця попередника мРНК.

[0078] "Трансляційною лідерною послідовністю" або "5'некодуєчими послідовностями" зазвичай називаються нуклеотидні послідовності, розташовані в гені між послідовністю промотору кодуєчою послідовністю. Трансляційна лідерна послідовність присутня в повністю процесованій мРНК вище послідовності ініціації трансляції. Трансляційна лідерна послідовність може впливати на процесинг первинного транскрипту в мРНК, стабільність мРНК або трансляційну ефективність.

[0079] Як правило, термін "функціонально зв'язаний" належить до з'єднання двох або більше нуклеотидних фрагментів в один нуклеотидний фрагмент таким чином, що один фрагмент впливає на функціонування іншого. Наприклад, промотор функціонально зв'язаний з кодуєчою послідовністю, якщо він здатний впливати на експресію цієї кодуєчої послідовності (тобто, якщо кодуєча послідовність знаходиться під транскрипційним управлінням промотора). Кодуючі послідовності можуть бути функціонально зв'язані з регуляторними послідовностями в смисловій або антисмисловій орієнтації.

[0080] Кодуюча область трансгену може містити одну або більше мовчазних мутацій для оптимізації частоти використання кодонів для конкретного типу клітин. Наприклад, кодони трансгену I2S можна оптимізувати для експресії в клітинах хребетних. У деяких варіантах реалізації винаходу кодони трансгену I2S можна оптимізувати для експресії в клітинах ссавців. У деяких варіантах реалізації винаходу кодони трансгену I2S можна оптимізувати для експресії в клітинах людини.

[0081] У деяких випадках конструкція може містити додаткові компоненти, такі як один або більше з наступних елементів: сайт сплайсингу, послідовність енхансеру, ген маркеру, що селекується, під управлінням відповідного промотору, ген маркеру, що ампліфікується, під управлінням відповідного промотору ділянка прикріплення до матриксу (ДПМ) або будь-який інший відомий в цій галузі техніки елемент, який підвищує експресію області, в яку він вставлений.

[0082] Після трансфікування або трансдукування в клітини-хазяїні придатний вектор може експресувати позахромосомо (епісомально) або інтегруватися в геном клітини-хазяїна.

Активация рекомбинантных белков I2S

[0083] Як правило, рекомбинантний білок I2S активують за допомогою посттрансляційної модифікації консервативного цистеїну (відповідного амінокислоти 59 зрілого людського I2S) в формілгліцин, також відомий під назвою 2-аміно-3-оксопропіонової кислоти або оксо-аланіну.

5 Таку посттрансляційну модифікацію можна здійснити за допомогою ферменту, відомого під назвою формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE). Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантні ферменти I2S виробляються в клітинах, які експресують також білок FGE. У конкретних варіантах реалізації винаходу рекомбіантні ферменти I2S виробляються в клітинах, які характеризуються підвищеною або посиленою експресією білка FGE. Наприклад, клітини можна сконструювати для надекспресії FGE в комбінації з рекомбіантним I2S для полегшення одержання препаратів I2S, що містять високі рівні активного ферменту. У деяких варіантах реалізації винаходу надекспресію FGE досягають за допомогою експресії (наприклад, надекспресії) екзогенного FGE за допомогою стандартних рекомбіантних технологій. У деяких варіантах реалізації винаходу надекспресію FGE досягають за допомогою активації або посилення експресії ендогенного FGE, наприклад, активуючи або посилюючи промотор ендогенного гену FGE. У деяких випадках нуклеїнова кислота, кодуюча рекомбіантний I2S, та нуклеїнова кислота, кодуюча рекомбіантний білок FGE, зв'язані нуклеїновою кислотою (наприклад, спейсерною послідовністю), що має послідовність, відповідну ділянці внутрішньої посадки рибосоми.

20 [0084] У цьому винаході можна застосовувати будь-який FGE, що має здатність перетворювати цистеїн у формілгліцин. Типові нуклеотидні та амінокислотні послідовності білків FGE наведені у US 2004-0229250, повний зміст якої, що відноситься до таких послідовностей, та самі послідовності в повному обсязі включені в цей документ шляхом посилання. Слід враховувати, що нуклеїнові кислоти, кодуючі рекомбіантний FGE можуть містити регуляторні послідовності, регуляторні послідовності генів, промотори, некодуючі послідовності та/або інші придатні послідовності для експресії рекомбіантного FGE. Як правило, кодуюча область функціонально зв'язана з одним або більше з цих компонентів нуклеїнової кислоти.

Середовища та умови для культивування клітин

30 [0085] Для отримання рекомбіантного білка I2S можна застосовувати різні середовища та умови для культивування клітин. Наприклад, рекомбіантний білок I2S можна отримати у середовищі, що містить сироватку або безсироватковому середовищі. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантний білок I2S отримують у безсироватковому середовищі. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантний білок I2S отримують у нетваринному середовищі, тобто, середовищі, в якому відсутні компоненти тваринного походження. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантний білок I2S отримують в хімічно визначеному середовищі. Термін "хімічно визначене живильне середовище", який використовується в цьому документі, належить до середовища, практично всі хімічні компоненти якого відомі. У деяких варіантах реалізації винаходу хімічно визначене живильне середовище не містить компонентів тваринного походження, таких як сироватка, сироваткові білки (наприклад, альбумін або фетун) та інші компоненти. У деяких випадках хімічно визначене середовище містить один або більше білків (наприклад, білкових факторів росту або цитокінів). У деяких випадках хімічно визначене живильне середовище містить один або більше білкових гідролізатів. В інших випадках хімічно визначене живильне середовище є безбілковим середовищем, тобто, безсироватковим середовищем, яке не містить білків, гідролізатів або компонентів з невідомою композицією.

45 [0086] В деяких варіантах реалізації винаходу хімічно визначене живильне середовище може бути доповненим одним або більше компонентами тваринного походження. Такі компоненти тваринного походження включають, але не обмежуються цим, фетальну телячу сироватку, кінську сироватку, козячу сироватку, осячу сироватку, людську сироватку та сироваткові білки, такі як альбуміни (наприклад, бичачий сироватковий альбумін або людський сироватковий альбумін).

50 [0087] Для отримання рекомбіантних білків I2S у промислових масштабах можна застосовувати різні умови клітинного культивування, включаючи, але не обмежуючись цим, культивування в ролерних флаконах, періодичне культивування в біореакторах та культивування з підживленням в біореакторах. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантний білок I2S отримують за допомогою клітин, культивованих в суспензії. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбіантний білок I2S отримують за допомогою адгезивних клітин.

60 [0088] Типові середовища для клітин та умови культивування описані в розділі Прикладів. Додаткові типові способи такої композиції для отримання рекомбіантного білка I2S описані в попередній заявці під назвою "Способи та композиції для отримання рекомбіантної ідуронат-2-

сульфатази", поданої на реєстрацію одночасно з цим документом, повний зміст якої включений в цей документ шляхом посилання.

Очищення рекомбінантного білка I2S

[0089] У деяких варіантах реалізації винаходу в цьому винаході запропонований спосіб очищення рекомбінантного білка I2S з неочищеного препарату за допомогою процесу на основі одного або більше способів з аніонообмінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, хроматографії з комбінованим режимом та хроматографії з гідрофобною взаємодією. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає менше 6 (наприклад, менше 5, менше 4, або менше 3) хроматографічних етапів. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає 2, 3, 4 або 5 хроматографічних етапів. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначений спосіб згідно з цим винаходом включає проведення хроматографічних етапів в такому порядку: аніонообмінна хроматографія, хроматографія з комбінованим режимом, катіонообмінна хроматографія та хроматографія з гідрофобною взаємодією.

Неочищений препарат

[0090] У контексті цього документу неочищений препарат може являти собою будь-який біологічний матеріал, включаючи необроблений біологічний матеріал, що містить рекомбінантний білок I2S. Наприклад, неочищений препарат може являти собою необроблене клітинне культуральне середовище, що містить рекомбінантний білок I2S, який секретується з клітин (наприклад, клітин ссавців), що виробляють білок I2S, або вихідні клітинні лізати, що містять білок I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу неочищений препарат може являти собою частково оброблене клітинне середовище або клітинні лізати. Наприклад, клітинне середовище або клітинні лізати можна концентрувати, розводити, обробляти шляхом вірусної інактивації, вірусної обробки або вірусного видалення. У деяких варіантах реалізації винаходу для вірусного видалення, серед іншого, можна застосовувати нанофільтрацію та/або хроматографічні методи. У деяких варіантах реалізації винаходу для вірусної інактивації, серед іншого, можна застосовувати інактивацію розчином, інактивацію детергентом, пастеризацію, інактивацію кислотним рН та/або інактивацію ультрафіолетом. Клітинне середовище або клітинні лізати також можна обробляти протеазами, ДНКазами та/або РНКазами для того, щоб знизити рівень білка та/або нуклеїнових кислот (наприклад, ДНК або РНК) клітини-хазяїна. У деяких варіантах реалізації винаходу необроблені або частково оброблені біологічні матеріали (наприклад, клітинне середовище або клітинний лізат) можна заморожувати та зберігати при обраній температурі (наприклад, 2-8 °C, -4 °C, -25 °C, -75 °C) на протязі деякого часу, а потім розморожувати для очищення. У контексті цього документа неочищеним препаратом також називають стартовий матеріал або завантажувальний матеріал.

Аніонообмінна хроматографія

[0091] У деяких варіантах реалізації винаходу запропоновані способи очищення рекомбінантного білка I2S включають аніонообмінну хроматографію. Коротко, аніонообмінна хроматографія являє собою хроматографічний спосіб, заснований на заряд-зарядових взаємодіях між негативно зарядженою сполукою та позитивно зарядженою смолою. У деяких варіантах реалізації винаходу аніонообмінна хроматографія являє собою сильну аніонообмінну хроматографію. У деяких варіантах реалізації винаходу аніонообмінну хроматографію застосовують на першому етапі очищення терапевтичного білку (наприклад, рекомбінантного I2S).

[0092] Типові аніонообмінні смоли включають, але не обмежуються цим, четвертинні смоли амінів або "Q-смоли" (наприклад, Капто™-Q, Q-Сефарозу®, QAE Сефадекс®); діетиламіноетанові (DEAE) смоли (наприклад, DEAE-Трисакрил®, DEAE Сефарозу®, бензоїльований нафтоїльований DEAE, діетиламіноетил Сефацель®); смоли Amberjet®; смоли Amberlyst®; смоли Amberlite® (наприклад, Amberlite®IRA-67, сильноосновну Amberlite®, слабоосновну Amberlite®), холестерамінову смолу, смоли ProPac® (наприклад, ProPac®SAX-10, ProPac®WAX-10, ProPac®WCX-10); смоли TSK-GEL® (наприклад, TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); та смоли Acclaim®. У певних варіантах реалізації винаходу аніонообмінною смолою є Q-смола.

[0093] Типові рухомі фази для аніонообмінної хроматографії включають відносно полярні розчини, такі як вода, ацетонітрил, органічні спирти, такі як метанол, етанол і ізопропанол, або розчини, що містять 2-(N-морфоліно)-етансульфонову кислоту (MEC). Таким чином, в певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить приблизно 0 %, 1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або приблизно 100 % полярного розчину. В певних варіантах

реалізації винаходу рухома фаза містить від приблизно 1 % до приблизно 100 %, від приблизно 5 % до приблизно 95 %, від приблизно 10 % до приблизно 90 %, від приблизно 20 % до приблизно 80 %, від приблизно 30 % до приблизно 70 % або від приблизно 40 % до приблизно 60 % полярного розчину в будь-який заданий час протягом етапу поділу.

[0094] У загальному випадку рухома фаза містить сіль. Наприклад, сіль (наприклад, хлорид натрію) може елюювати зв'язаний білок з аніонообмінної колонки (наприклад, хлорид є протиіоном та відбувається його обмін з цільовим білком, який згодом виділяється). У деяких варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить концентрацію солі від приблизно 0 до приблизно 1,0 М, наприклад, від приблизно 0 до приблизно 0,8 М, від приблизно 0 до приблизно 0,6 М, від приблизно 0 до приблизно 0,5 М, від приблизно 0 до приблизно 0,4 М, від приблизно 0,05 М до приблизно 0,50 М, від приблизно 0,10 М до приблизно 0,45 М, від приблизно 0,10 М до приблизно 0,40 М або від приблизно 0,15 М до приблизно 0,40 М. У деяких варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить концентрацію солі, що містить приблизно 0,01 М, 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М, 0,06 М, 0,07 М, 0,08 М, 0,09 М, 0,1 М, 0,2 М, 0,3 М, 0,4 М, 0,5 М, 0,6 М, 0,7 М, 0,8 М, 0,9 М або 1,0 М. В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі є градієнтною (наприклад, лінійно- або нелінійно-градієнтною). В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі є постійною. В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі може покроково підвищуватися або знижуватися.

[0095] Як правило, рухома фаза є забуференою. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза не є забуференою. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до pH від приблизно 5 до приблизно 14. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до pH від приблизно 5 до приблизно 10. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до pH від приблизно 5 до приблизно 7. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до pH, що становить приблизно 6,5. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до pH, що становить приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 або 10.

[0096] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у аніонообмінну хроматографічну колонку (наприклад, Q-колонку) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до рівня pH, що становить приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 або 7,5, і провідності, що становить приблизно 2 мсм/см, 4 мсм/см, 6 мсм/см, 8 мсм/см, 10 мсм/см, 12 мсм/см, 14 мсм/см, 16 мсм/см, 18 мсм/см або 20 мсм/см. pH можна доводити, застосовуючи ацетат натрію (наприклад, 1 М), а провідність можна доводити, застосовуючи хлорид натрію (наприклад, 5 М). Після завантаження аніонообмінну хроматографічну колонку можна промивати, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 140 мм до 200 мм (наприклад, приблизно 140 мм, 145 мм, 150 мм, 155 мм, 160 мм, 165 мм, 170 мм, 175 мм, 180 мм, 185 мм, 190 мм, 195 мм або 200 мм) з pH, що становить приблизно 5,0-7,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 або 7,5). Аніонообмінну хроматографічну колонку можна елюювати, застосовуючи елюючий буфер, який характеризується лінійним градієнтом NaCl. Придатний лінійний градієнт NaCl може характеризуватися діапазоном, що становить приблизно 0-500 мм NaCl (наприклад, приблизно 0-400 мм, приблизно 0-350 мм, приблизно 0-300 мм, приблизно 50-500 мм, приблизно 150-500 мм, приблизно 150-450 мм, приблизно 150-400 мм).

Катіонообмінна хроматографія

[0097] У деяких варіантах реалізації винаходу запропоновані способи очищення рекомбінантного білка I2S включають катіонообмінну хроматографію. Коротко, катіонообмінна хроматографія являє собою хроматографічний спосіб, заснований на заряд-зарядових взаємодіях між позитивно зарядженою сполукою та негативно зарядженою смолою. У деяких варіантах реалізації винаходу катіонообмінна хроматографія являє собою сильну катіонообмінну хроматографію.

[0098] На практиці катіонообмінну хроматографію в загальному випадку проводять як з сильною, так і зі слабкою катіонообмінною колонкою, що містить сульфонієві іони, або зі слабким катіонообмінником, який зазвичай містить карбоксиметильну (КМ) або карбоксилатну (ККС) функціональну групу. Багато придатних катіонообмінних смол відомі в цій галузі техніки і є комерційно доступними, включаючи, але не обмежуючись цим, SP-Сефарозу®, CM Сефарозу®, смоли Amberjet®, смоли Amberlyst®, смоли Amberlite® (наприклад, Amberlite® IRA120); смоли ProPac® (наприклад, ProPac® SCX-10, ProPac® WCX-10, ProPac® WCX-10); смоли TSK-GEL® (наприклад, TSKgel BioAssist S; TSKgel SP-2 SW, TSKgel SP-5 PW; TSKgel SP-NPR; TSKgel SCX; TSKgel SP-STAT; TSKgel CM-5PW; TSKgel OAPak-A; TSKgel CM-2SW, TSKgel CM-3SW і TSKgel CM-STAT); і смоли Acclaim®. В певних варіантах реалізації винаходу катіонообмінною

смолою є смола SP-Цефароза®.

[0099] Типові рухомі фази для катіонообмінної хроматографії включають відносно полярні розчини, такі як вода, ацетонітрил, органічні спирти, такі як метанол, етанол та ізопропанол, або розчини, що містять 2-(N-морфоліно)-етансульфонову кислоту (МЕС). Таким чином, в певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить приблизно 0 %, 1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або приблизно 100 % полярного розчину. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить від приблизно 1 % до приблизно 100 %, від приблизно 5 % до приблизно 95 %, від приблизно 10 % до приблизно 90 %, від приблизно 20 % до приблизно 80 %, від приблизно 30 % до приблизно 70 % або від приблизно 40 % до приблизно 60 % полярного розчину в будь-який заданий час протягом етапу розділення.

[00100] У загальному випадку рухома фаза містить сіль. Наприклад, сіль (наприклад, хлорид натрію, фосфат натрію тощо) може елююватися зв'язаний білок з катіонообмінної колонки (наприклад, натрій є протиіоном та відбувається його обмін з цільовим білком, який згодом виділяється). В деяких варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить концентрацію солі від приблизно 0 до приблизно 1,0 М, наприклад, від приблизно 0 до приблизно 0,8 М, від приблизно 0 до приблизно 0,6 М, від приблизно 0 до приблизно 0,5 М, від приблизно 0 до приблизно 0,4 М, від приблизно 0,05 М до приблизно 0,50 М, від приблизно 0,10 М до приблизно 0,45 М, від приблизно 0,10 М до приблизно 0,40 М або від приблизно 0,15 М до приблизно 0,40 М. В деяких варіантах реалізації винаходу рухома фаза містить концентрацію солі, яка становить приблизно 0,01 М, 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М, 0,06 М, 0,07 М, 0,08 М, 0,09 М, 0,1 М, 0,2 М, 0,3 М, 0,4 М, 0,5 М, 0,6 М, 0,7 М, 0,8 М, 0,9 М або 1,0 М. В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі є градієнтною (наприклад, лінійно- або нелінійно-градієнтною). В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі є постійною. В деяких варіантах реалізації винаходу концентрація солі в рухомій фазі може покроково підвищуватися або знижуватися.

[00101] Як правило, рухома фаза є забуференою. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза не є забуференою. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до рН від приблизно 5 до приблизно 14. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до рН від приблизно 5 до приблизно 10. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до рН від приблизно 5 до приблизно 7. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до рН, що становить приблизно 6,5. В певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза забуферена до рН, що становить приблизно 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 або 10.

[00102] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у катіонообмінну хроматографічну колонку (наприклад, SP-колонку) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до провідності в діапазоні між приблизно 1 мсм/см і 20 мсм/см (наприклад, між приблизно 1 мсм/см і 15 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см і 10 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см і 8 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см і 6 мсм/см, між приблизно 1 мсм/см і 4 мсм/см, між приблизно 2 мсм/см і 4 мсм/см). У конкретних варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у катіонообмінну хроматографічну колонку (наприклад, SP-колонку) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до провідності в діапазоні між приблизно 2 мсм/см та 4 мсм/см (наприклад, 2, 2,5, 3, 3,5 або 4 мсм/см). Значення провідності можна доводити, розводячи неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію H_2O у співвідношенні, що становить, наприклад, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 4,0:1, 5,0:1 або 10:1. Значення провідності також можна доводити діалізацією у відповідний буфер. Провідність також можна доводити за допомогою діалізації у відповідний буфер. У деяких варіантах реалізації винаходу катіонообмінну хроматографію проводять на колонці за рівня рН, що становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5). У деяких варіантах реалізації винаходу катіонообмінну хроматографію проводять на колонці з буфером, що містить концентрацію фосфату (наприклад, $NaPO_4$) в діапазоні від приблизно 0,01 М до приблизно 0,1 М (наприклад, приблизно 0,01 М, 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М, 0,06 М, 0,07 М, 0,08 М, 0,09 М або 0,1 М). У деяких варіантах реалізації винаходу придатний рівень рН становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5).

Хроматографія з комбінованим режимом

[00103] Вважається, що гідроксиапатитова хроматографія (НА) є "псевдоафінною" хроматографією або іонообмінною хроматографією з "комбінованим режимом", і може застосовуватися відповідно до цього винаходу. Гідроксиапатит являє собою унікальну форму фосфату кальцію, застосовувану для фракціонування та очищення біологічних молекул. У

деяких випадках можна застосовувати кристалічний гідроксиапатит, проте неміцність кристалів може обмежувати швидкості потоків та/або довговічність колонки. Два типи хімічно чистого керамічного гідроксиапатиту - керамічний гідроксиапатит для СНТ типів ІІІ - є макропористимита сферичними та можуть застосовуватися при високих швидкостях потоків та тисках. Тип І зазвичай характеризується високою здатністю зв'язування білків, у той час як тип ІІ зазвичай характеризується більш низькою здатністю зв'язування білків. Загальною формулою гідроксиапатиту є $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kawasaki, et al 1985). Функціональні групи містять позитивно заряджені пари іонів кальцію кристалу (С-ділянки) та кластери з шести негативно заряджених атомів кисню, зв'язані з триплетами фосфатів кристалу (Р-ділянки). С-ділянки, Р-ділянки та гідроксильні розподілені в визначеному порядку на кристалічній поверхні, що в загальному випадку призводить до складної взаємодії з білками та іншими молекулами.

[00104] Зразок можна завантажувати в НА-колонку в фосфатний буфер зі слабкою іонною силою (наприклад, 1-10 мм фосфат натрію або калію) або при нейтральному або практично нейтральному рН. У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до концентрації фосфату (наприклад, NaPO_4) в діапазоні від приблизно 0,001 М до приблизно 0,01 М (наприклад, приблизно 0,001 М, 0,002 М, 0,003 М, 0,004 М, 0,005 М, 0,006 М, 0,007 М, 0,008 М, 0,009 М або 0,01 М) та рівня рН, що становить приблизно 5,0-6,5 (наприклад, приблизно 5,0, 5,5, 6,0 або 6,5). Завантажену НА-колонку зазвичай промивають відмивним буфером з концентрацією фосфату, порівняною з відповідною концентрацією для завантажувального буфера. У деяких варіантах реалізації винаходу колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) після завантаження промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить фосфат (наприклад, 1-10 мм фосфат натрію або калію) з нейтральними або практично нейтральним рН. Наприклад, придатний відмивний буфер може містити концентрацію фосфату, що становить приблизно 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 6 мм, 7 мм, 8 мм, 9 мм або 10 мм. У деяких варіантах реалізації винаходу може бути доцільно збільшувати кількість фосфату у відмивному буфері для того, щоб створити більш жорсткі умови відмивання. Передбачається, що рівні М6Р, зокрема, рівні ди-М6Р, на поверхні білків І2S важливі для лізосомного націлювання. Підвищена концентрація фосфату в відмивному буфері може вибірково утримувати білки І2S з високими рівнями М6Р, зокрема, ди-М6Р, на НА-колонці. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу доцільний відмивний буфер може містити концентрацію фосфату більшу, ніж 10 мм, 11 мм, 12 мм, 13 мм, 14 мм, 15 мм, 16 мм, 17 мм, 18 мм, 19 мм, 20 мм. У деяких варіантах реалізації винаходу завантажену колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію фосфату в діапазоні, що становить приблизно 10-20 мм (наприклад, приблизно 10-18 мм, 10-16 мм, 10-15 мм, 12-20 мм, 14-18 мм, 14-16 мм). У деяких варіантах реалізації винаходу завантажену колонку для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонку) промивають, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію фосфату більшу, ніж 10 мм, 11 мм, 12 мм, 13 мм, 14 мм, 15 мм, 16 мм, 17 мм, 18 мм, 19 мм, 20 мм.

[00105] Елюювання з НА-колонки зазвичай проводять за допомогою градієнтного фосфатного буферу. Наприклад, придатний елююючий буфер може характеризуватися фосфатним градієнтом, що становить приблизно 1-400 мм (наприклад, 1-300 мм, 1-200 мм, 1-150 мм, 1-100 мм, 10-350 мм, 10-300 мм, 10-250 мм, 10-200 мм, 10-150 мм, 10-140 мм, 10-130 мм, 10-120 мм, 10-110 мм, 10-100 мм, 10-90 мм, 10-80 мм, 10-70 мм, 10-60 мм, 10-50 мм) фосфату натрію або фосфату калію. У деяких варіантах реалізації винаходу елюювання з НА-колонки проводять за допомогою ступінчастого підвищення концентрації фосфату в буфері для елюювання. У деяких варіантах реалізації винаходу ступінчасті буфери для елюювання можуть містити концентрацію фосфату, вибрану з 10 мм, 20 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм, 150 мм, 200 мм, 250 мм, 300 мм, 350 мм, 400 мм. У деяких варіантах реалізації винаходу елюювання з колонки для хроматографії з комбінованим режимом (наприклад, НА-колонки) проводять за допомогою буферу для елюювання, що містить концентрацію фосфату (наприклад, фосфату натрію) в діапазоні від приблизно 50 мм до 150 мм (наприклад, вибраної з концентрацій фосфату (наприклад, фосфату натрію), що становлять 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм, 150 мм та їхніх комбінацій).

[00106] Слід враховувати, що відомо багато різних комбінацій умов для НА-хроматографії, які можна застосовувати для доведення параметрів до величин, придатних для конкретного білка, що становить інтерес (наприклад, рекомбінантного І2S).

Хроматографія з гідрофобною взаємодією

[00107] Хроматографія з гідрофобною взаємодією (ХГВ) являє собою спосіб розділення, в якому властивості гідрофобності використовуються для відділення білків один від одного. У випадку цього типу хроматографії до стаціонарної колонки прикріплені гідрофобні групи, такі як феніл, октил або бутіл. Білки, які проходять через колонку та які містять на поверхні гідрофобні амінокислотні бічні ланцюги здатні взаємодіяти та зв'язуватися з гідрофобними групами на колонці. Відомі ХГВ-колонки включають, наприклад, феніл-сефарозу.

[00108] Для ХГВ-розділення часто застосовують умови, протилежні тим, які застосовувалися в іонообмінній хроматографії. У загальному випадку в колонці спочатку застосовують буфер, що характеризується високою іонною силою, зазвичай - сульфат амонію. Сіль в буфері знижує сольватацію розчинених у зразку компонентів, таким чином, коли сольватація знижується, гідрофобні ділянки, що стали відкритими, адсорбуються середовищем. Стаціонарна фаза в загальному випадку підібрана таким чином, щоб створювати гідрофобні взаємодії з іншими молекулами. Такі взаємодії зазвичай занадто слабкі у воді, проте додавання солей (наприклад, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr і NaSCN) в буфер призводить до появи гідрофобних взаємодій. У деяких варіантах винаходу рухома фаза містить концентрацію солі від приблизно 0,1 М до приблизно 3,0 М, наприклад, від приблизно 0,1 М до приблизно 1,5 М, від приблизно 0,2 М до приблизно 0,8 М або від приблизно 0,3 М до приблизно 0,5 М.

[00109] Впевних варіантах реалізації винаходу рухома фаза є забуференою. Впевних варіантах реалізації винаходу рухома фаза не є забуференою. Впевних варіантах реалізації винаходу рухома фаза є забуференою до рН від приблизно 5 до приблизно 14. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза є забуференою до рН від приблизно 5 до приблизно 10. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза є забуференою до рН від приблизно 5 до приблизно 7. У певних варіантах реалізації винаходу рухома фаза є забуференою до рН, що становить приблизно 5,0.

[00110] У деяких варіантах реалізації винаходу перед завантаженням у колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією (наприклад, колонку з фенілом) неочищений препарат або проміжний елюат, або проточну фракцію доводять до концентрації солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,5 М до приблизно 2,0 М (наприклад, приблизно 0,5 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М або 2,0 М NaCl) та рівня рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0). Після завантаження колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією можна промивати, застосовуючи відмивний буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,5 М до 2,0 М (наприклад, приблизно 0,5 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М або 2,0 М) при рівні рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0). У деяких варіантах реалізації винаходу колонку для хроматографії з гідрофобною взаємодією елюють, застосовуючи елюючий буфер, що містить концентрацію солі (наприклад, NaCl) в діапазоні від приблизно 0,1 М до приблизно 0,5 М (наприклад, приблизно 0,1 М, 0,2 М, 0,3 М, 0,4 М або 0,5 М NaCl) при рівні рН, що становить приблизно 4,5-6,0 (наприклад, приблизно 4,5, 5,0, 5,5 або 6,0).

Визначення характеристик очищених білків I2S

[00111] Визначити характеристики очищеного рекомбінантного білку I2S можна за допомогою багатьох різних способів.

Ступінь очищення

[00112] Ступінь очищення очищеного рекомбінантного білку I2S зазвичай визначають за рівнем різних домішок (наприклад, білку клітини-хазяїна або ДНК клітини-хазяїна), присутніх в кінцевому продукті. Наприклад, рівень білку клітини-хазяїна (БКХ) можна визначити за допомогою ELISA або ДСН-ПААГ. У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S містить менше 150 нг БКХ /мг білка I2S (наприклад, менше 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 нг БКХ /мг білка I2S). У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S при проведенні ДСН-ПААГ із забарвленням сріблом не має нових смуг з інтенсивністю більшою, ніж 0,05 %, 0,01 %, 0,15 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,35 %, 0,4 %, 0,45 % або 0,5 % від контрольного зразка. Можна використовувати різні контрольні зразки, зокрема ті, які затверджені регуляторними органами, такими як FDA.

Специфічна активність

[00113] Характеристики очищеного рекомбінантного білка I2S можна отримати, оцінюючи його функціональну та/або біологічну активність. Ферментативну активність композиції, що містить рекомбінантний I2S, можна визначити за допомогою відомих в цій галузі техніки способів. Як правило, зазначені способи включають детекцію видалення сульфату із синтетичного субстрату, останній спосіб відомий під назвою аналізу виділення сульфату. Один

з прикладів аналізу ферментативної активності включає застосування іонної хроматографії. У цьому способі оцінюють кількість сульфат-іонів, які ферментативно вивільняються рекомбінантним I2S з субстрату. Субстрат може бути природним субстратом або синтетичним субстратом. У деяких випадках субстратом є гепарин сульфат (наприклад, гепарин дисахарид), дерматан сульфат або їхній функціональний еквівалент. Як правило, виділений сульфат-іон аналізують за допомогою іонної хроматографії із застосуванням детекторів провідності. У цьому прикладі результати можна наводити у Од/мг білку, де 1 одиниця відповідає кількості ферменту, необхідного для вивільнення з субстрату 1 мкмоль сульфат-іонів на годину. У деяких варіантах реалізації винаходу специфічна активність очищеного рекомбінантного білка I2S, визначена за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду, знаходиться в діапазоні приблизно 0-100 Од/мг, приблизно 10-100 Од/мг, приблизно 10-80 Од/мг, приблизно 20-80 Од/мг, приблизно 20-70 Од/мг, приблизно 20-60 Од/мг, приблизно 20-50 Од/мг, приблизно 30-100 Од/мг, приблизно 30-90 Од/мг, приблизно 30-80 Од/мг, приблизно 30-70 Од/мг, приблизно 30-60 Од/мг, приблизно 40-100 Од/мг, приблизно 40-90 Од/мг, приблизно 40-80 Од/мг, приблизно 40-70 Од/мг, приблизно 40-60 Од/мг. У деяких варіантах реалізації винаходу специфічна активність очищеного рекомбінантного білка I2S, визначена за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду, становить щонайменше приблизно 5 Од/мг, приблизно 10 Од/мг, приблизно 15 Од/мг, приблизно 20 Од/мг, приблизно 25 Од/мг, приблизно 30 Од/мг, приблизно 35 Од/мг, приблизно 40 Од/мг, приблизно 45 Од/мг, приблизно 50 Од/мг, приблизно 55 Од/мг, приблизно 60 Од/мг, приблизно 65 Од/мг, приблизно 70 Од/мг, приблизно 75 Од/мг, приблизно 80 Од/мг, приблизно 85 Од/мг, приблизно 90 Од/мг, приблизно 95 Од/мг або приблизно 100 Од/мг. Типові умови для проведення визначення *in vitro* активності вивільнення сульфату із застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду наведені нижче. Як правило, в цьому методі визначають здатність I2S вивільняти сульфат-іони з субстрату природного походження – гепарин дисахариду. Кількість вивільненого сульфату можна визначити за допомогою іонної хроматографії. В деяких випадках іонна хроматографія включає використання детектору з провідності. В якості необмежуючого прикладу можна навести схему, в якій зразкам спочатку замінюють буфер на 10 мм ацетату Na, pH 6, для усунення пригнічення фосфат-іонами в буферній суміші. Потім зразки розводять до 0,075 мг/мл реакційним буфером (10 мм ацетату Na, pH 4,4) та інкубують протягом 2 г при 37°C з гепарин дисахаридом за співвідношення ферменту та субстрату, відповідному 0,3 мкг I2S/100 мкг субстрату в 30 мкл реакційному об'ємі. Потім реакцію зупиняють шляхом нагрівання зразків при 100°C протягом 3 хв. Аналіз проводять, використовуючи аналітичну колонку Dionex IonPac AS18 з передколonoю IonPac AG18. Застосовують ізократичний метод з 30 мм гідроксиду калію при 1,0 мл/хв протягом 15 хвилин. Кількість сульфату, вивільненого зразком I2S, розраховують, використовуючи лінійно-регресійний аналіз сульфатних проб в діапазоні від 1,7 до 16,0 нмоль. Величину, що фіксується, виражають в одиницях на мг білку, де 1 одиниця відповідає 1 мкмоль сульфату, що вивільняється на годину, а концентрацію білку визначають за допомогою вимірів A280.

[00114] У деяких варіантах реалізації винаходу ферментативну активність рекомбінантного білку I2S можна також визначити за допомогою багатьох інших способів, відомих в цій галузі техніки, таких як, наприклад, аналіз з 4-MUF, в якому оцінюють гідроліз 4-метилумбеліферил-сульфату на сульфат і природний флуоресцентний 4-метилумбеліферил (4-MUF). У деяких варіантах реалізації винаходу визначена за допомогою *in vitro* аналізу з 4-MUF придатна ферментативна активність отриманого рекомбінантного білку I2S становить щонайменше приблизно 0,5 Од/мг, 1,0 Од/мг, 1,5 Од/мг, 2 Од/мг, 2,5 Од/мг, 3 Од/мг, 4 Од/мг, 5 Од/мг, 6 Од/мг, 7 Од/мг, 8 Од/мг, 9 Од/мг, 10 Од/мг, 12 Од/мг, 14 Од/мг, 16 Од/мг, 18 Од/мг або 20 Од/мг. У деяких варіантах реалізації винаходу визначена за допомогою *in vitro* аналізу з 4-MUF придатна ферментативна активність отриманого рекомбінантного білку I2S знаходиться в діапазоні, що становить приблизно 0-50 Од/мг (наприклад, приблизно 0-40 Од/мг, приблизно 0-30 Од/мг, приблизно 0-20 Од/мг, приблизно 0-10 Од/мг, приблизно 2-50 Од/мг, приблизно 2-40 Од/мг, приблизно 2-30 Од/мг, приблизно 2-20 Од/мг, приблизно 2-10 Од/мг, приблизно 4-50 Од/мг, приблизно 4-40 Од/мг, приблизно 4-30 Од/мг, приблизно 4-20 Од/мг, приблизно 4-10 Од/мг, приблизно 6-50 Од/мг, приблизно 6-40 Од/мг, приблизно 6-30 Од/мг, приблизно 6-20 Од/мг, приблизно 6-10 Од/мг). Типові умови для проведення *in vitro* аналізу з 4-MUF наведені нижче. Як правило, за допомогою аналізу з 4-MUF визначають здатність білку I2S здійснювати гідроліз 4-метилумбеліферил-сульфату (4-MUF-SO₄) на сульфат та природний флуоресцентний 4-метилумбеліферил (4-MUF). Одна міліодиниця активності відповідає кількості ферменту, необхідного для перетворення одного наномолю 4-MUF-SO₄ в 4-MUF на одну хвилину при

37 °C. Як правило, згенеровані пробними зразками з відомою активністю середні одиниці флуоресценції (СОФ) можна застосовувати для побудови стандартної кривої, яку можна використовувати для розрахунку ферментативної активності зразку, який становить інтерес. Потім специфічну активність можна визначити, розділивши ферментативну активність на

5

концентрацію білка.
[00115] У будь-якому прикладі концентрацію білку в композиції, що містить рекомбінантний I2S, можна визначити будь-яким відомим в ційгалузі техніки придатним способом для визначення концентрації білку. У деяких випадках концентрацію білку визначають за поглинанням ультрафіолетового світла. Подібний аналіз поглинання зазвичай проводять на

10

довжині хвилі приблизно 280 нм (A_{280}).

Профіль заряду

[00116] Очищений рекомбінантний білок I2S можна охарактеризувати асоційованим з білком профілем заряду. Як правило, профіль заряду білка відображає схему зарядів бічних ланцюгів, які зазвичай присутні на поверхні білку. Профіль заряду можна визначити шляхом проведення для білка іонообмінної (ІО) хроматографії (наприклад, ВЕРХ). У деяких варіантах реалізації винаходу "профілем заряду" називають групу величин, що представляють кількість білку, що елюються з іонообмінної колонки в момент часу після додавання в колонку рухомої фази, що містить обмінні іони.

15

[00117] Як правило, придатною іонообмінною колонкою є аніонообмінна колонка. Наприклад, профіль заряду можна визначити за допомогою сильної аніонообмінної хроматографії (САХ), застосовуючи систему для вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). У загальному випадку рекомбінантний I2S адсорбується на фіксованому позитивному заряді сильної аніонообмінної колонки, а градієнт зростаючої іонної сили із застосуванням рухомої фази із заданою швидкістю потоку елює групи рекомбінантного I2S з колонки пропорційно силі їх іонної взаємодії з позитивно зарядженою колонкою. Більш негативно заряджені (більш кислі) групи I2S елюються пізніше, ніж менш негативно заряджені (менш кислі) групи I2S. Концентрації білку в елюаті визначають за поглинанням ультрафіолетового світла (на 280 нм).

20

25

[00118] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний I2S адсорбується при значенні рН приблизно 8,0 в 20 мм Трис-НС1 на фіксованому позитивному заряді колонки MiniQPE, а градієнт зростаючої іонної сили із застосуванням рухомої фази, що містить 20 мм Трис-НС1, 1 М хлорид натрію, рН 8,0, зі швидкістю потоку 0,8 мл/хв елюють групи рекомбінантного I2S з колонки пропорційно силі їх іонної взаємодії з позитивно зарядженою колонкою.

30

[00119] У деяких варіантах реалізації винаходу профіль заряду може бути поданий у вигляді хроматограми, що ілюструє залежність одиниць поглинання від часу, що пройшов після елювання з ВЕРХ-колонки. Хроматограма може містити групу з одного або декількох піків, де кожний пік в групі відповідає субпопуляції рекомбінантних I2S зкомпозиції, які мають аналогічні поверхневі заряди.

35

[00120] У деяких варіантах реалізації винаходу профіль заряду для композиції, що містить очищений білок I2S, характеризується щонайменше шістьма піками. Типовий профіль заряду I2S проілюстрований в розділі Прикладів та на Фігурі 11. Як проілюстровано на Фігурі 11, шість піків позначені (від А до F) у порядку зростання величини негативного заряду і зниження вкладу в загальну пікову площу на хроматограмі. У деяких варіантах реалізації винаходу профіль заряду для композиції, що містить очищений рекомбінантний білок I2S, характеризується різною кількістю, розміром, формою або часовими інтервалами піків в залежності від кількості негативних або позитивних зарядів на поверхні білку. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція, що містить рекомбінантний білок I2S, має профіль заряду, який характеризується менше ніж 6 (наприклад, менше ніж 5, 4, 3 або 2) піками. У деяких варіантах реалізації винаходу профіль заряду рекомбінантного I2S може мати 5, 4, 3, 2 або 1 (пік)и. Наприклад, будь-які один, два, три, чотири або п'ять піків А, В, С, D, E і F можуть бути відсутніми або бути меншими за розміром в композиції, що містить очищений рекомбінантний білок I2S. Як правило, вважається, що профіль заряду є більш гомогенним у разі меншої кількості піків.

40

45

50

Картування гліканів

[00121] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S можна охарактеризувати за композицією його протеогліканів, а відповідний спосіб звичайно називають картуванням гліканів. Не прив'язуючись до будь-якої конкретної теорії, вважається, що гліканові зв'язки разом з формою та складністю розгалуженої структури можуть впливати на in vivo кліренс, лізосомне націлювання, біодоступність та/або ефективність.

55

[00122] Як правило, карту гліканів можна отримати за допомогою ферментного розщеплення та подальшого хроматографічного аналізу. Для ферментного розщеплення можна

60

застосовувати різні ферменти, включаючи, але не обмежуючись цим, придатні глікосилази, пептидази (наприклад, ендопептидази, екзопептидази), протеази та фосфатази. У деяких варіантах реалізації винаходу придатним ферментом є лужна фосфатаза. У деяких варіантах реалізації винаходу придатним ферментом є нейрамінідаза. Глікани (наприклад, фосфоглікани) можна детектувати за допомогою хроматографічного аналізу. Наприклад, фосфоглікани можна детектувати за допомогою високоефективної аніонообмінної хроматографії з імпульсним амперометричним детектуванням (ВЕАОХ-ІАД) або ексклюзивної високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Кількість гліканів (наприклад, фосфогліканів), що представляється кожним піком на карті гліканів, можна розрахувати за допомогою стандартної кривої гліканів (наприклад, фосфогліканів) відповідно до відомих в цій галузі техніки і розкритими в цьому документі способами.

[00123] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений І2S згідно з цим винаходом характеризується картою гліканів, що містить групи з семи піків, відповідних нейтральному (група піків 1), моносіальованому (група піків 2), дисіальованому (група піків 3), монофосфорильованому (група піків 4), трисіальованому (група піків 5), тетрасіальованому (група піків 6) та дифосфорильованому (група піків 7) білку І2S, відповідно. Типові карти гліканів для І2S проілюстровані на Фігурі 10. У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний І2S характеризується картою гліканів, яка містить менше 7 груп піків (наприклад, картою гліканів з 6, 5, 4, 3 або 2 групами піків). У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний І2S характеризується картою гліканів, яка містить понад 7 груп піків (наприклад, 8, 9, 10, 11, 12 або більше).

[00124] Відносну кількість гліканів, відповідну кожній групі піків, можна визначити на основі площі групи піків відносно відповідної площі групи піків в зумовленому еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу група піків 1 (нейтральні) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 40-120 % (наприклад, приблизно 40-115 %, приблизно 40-110 %, приблизно 40-100 %, приблизно 45-120 %, приблизно 45-115 %, приблизно 45-110 %, приблизно 45-105 %, приблизно 45-100 %, приблизно 50-120 %, приблизно 50-110 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 2 (моносіальовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 80-140 % (наприклад, приблизно 80-135 %, приблизно 80-130 %, приблизно 80-125 %, приблизно 90-140 %, приблизно 90-135 %, приблизно 90-130 %, приблизно 90-120 %, приблизно 100-140 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 3 (дисіальовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 80-110 % (наприклад, приблизно 80-105 %, приблизно 80-100 %, приблизно 85-105 %, приблизно 85-100 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 4 (монофосфорильовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 100-550 % (наприклад, приблизно 100-525 %, приблизно 100-500 %, приблизно 100-450 %, приблизно 150-550 %, приблизно 150-500 %, приблизно 150-450 %, приблизно 200-550 %, приблизно 200-500 %, приблизно 200-450 %, приблизно 250-550 %, приблизно 250-500 %, приблизно 250-450 % або приблизно 250-400 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 5 (трисіальовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 70-110 % (наприклад, приблизно 70-105 %, приблизно 70-100 %, приблизно 70-95 %, приблизно 70-90 %, приблизно 80-110 %, приблизно 80-105 %, приблизно 80-100 % або приблизно 80-95 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 6 (тетрасіальовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 90-130 % (наприклад, приблизно 90-125 %, приблизно 90-120 %, приблизно 90-115 %, приблизно 90-110 %, приблизно 100-130 %, приблизно 100-125 % або приблизно 100-120 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У деяких варіантах реалізації винаходу, група піків 7 (дифосфорильовані) може характеризуватися площею групи піків в діапазоні, що становить приблизно 70-130 % (наприклад, приблизно 70-125 %, приблизно 70-120 %, приблизно 70-115 %, приблизно 70-110 %, приблизно 80-130 %, приблизно 80-125 %, приблизно 80-120 %, приблизно 80-115 %, приблизно 80-110 %, приблизно 90-130 %, приблизно 90-125 %, приблизно 90-120 %, приблизно 90-115 %, приблизно 90-110 %) відносно відповідної площі групи піків в еталонному зразку. У цій області техніки відома велика кількість еталонних зразків для картування гліканів, які можна застосовувати для практичної реалізації цього винаходу. Як правило, група піків 7 (дифосфорильовані) відповідає рівню ди-М6Р на поверхні очищеного рекомбінантного білка І2S.

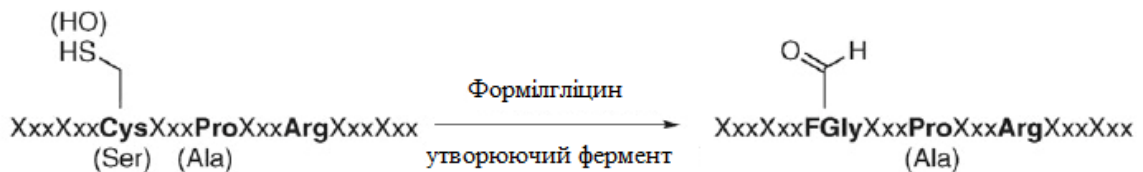
[00125] Передбачається, що схема глікозилювання очищеного I2S впливає на лізосомне націлювання. У цій галузі техніки відома велика кількість видів аналізу in vitro клітинного поглинання, які можна застосовувати для практичної реалізації цього винаходу. Наприклад, для оцінки поглинання I2S рецепторами M6P проводять аналіз клітинного поглинання із застосуванням людських фібробластів, експресуючих зі своєї поверхні рецептори M6P. Кількість I2S, що інтерналізується, можна визначити за методом ELISA. У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом характеризується клітинним поглинанням, визначеним за допомогою аналізу in vitro поглинання, що перевищує 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %.

Пептидне картування

[00126] В деяких варіантах реалізації винаходу можна застосовувати пептидне картування для характеристики амінокислотної композиції, посттрансляційних модифікацій та/або клітинного процесингу, такого як відщеплення сигнального пептиду, перетворення у формілгліцин та/або глікозилювання. Як правило, рекомбінантний білок можна розбити на окремі пептидні фрагменти шляхом контрольованого або випадкового поділу для того, щоб отримати відповідну схему або пептидну карту. У деяких випадках перед аналітичною оцінкою очищений білок I2S можна спочатку піддати ферментному розщепленню. Розщеплення перед аналітичною оцінкою можна проводити, застосовуючи пептидазу, глікозидгідролазу, фосфатазу, ліпазу або протеазу та/або їх комбінації. Структурну композицію пептидів можна визначити, застосовуючи добре відомі в цій галузі техніки способи. Типові способи включають, але не обмежуються цим, мас-спектрометрію, ядерний магнітний резонанс (ЯМР) або ВЕРХ.

Відсоток конверсії у формілгліцин

[00127] Для визначення відсотку конверсії у FGly можна застосовувати пептидне картування. Як обговорювалося вище, для активації I2S необхідна конверсія цистеїну (відповідної позиції 59 зрілого людського I2S) у формілгліцин за допомогою формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE) як показано нижче:



Отже, відсоток конверсії у формілгліцин (%ФГ) можна розрахувати, застосовуючи наступну формулу:

$$\% \text{ФГ (I2S)} = \frac{\text{Кількість активних молекул I2S}}{\text{Загальна кількість (активних+неактивних) молекул I2S}} \times 100$$

[00128] Для розрахунку %ФГ рекомбінантний білок I2S можна розщепити на короткі пептиди за допомогою протеаз (наприклад, трипсину або хімотрипсину). Короткі пептиди можна розділити та отримати їхні характеристики за допомогою, наприклад, високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Можна визначити характеристики пептиду, до складу якого входить позиція, яка відповідає позиції 59 зрілого людського I2S, щоб визначити, чи був Cys у позиції 59 перетворений у FGly, в порівнянні з контролем (наприклад, білком I2S без конверсії у FGly або білком I2S з 100 % конверсією у FGly). На основі відповідних пікових площ можна визначити кількість пептидів, що містять FGly (відповідну кількість активних молекул I2S), і загальну кількість пептидів, що містять FGly та Cys (відповідну загальну кількість молекул I2S), і розрахувати співвідношення, що відображає %ФГ.

[00129] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом містить щонайменше приблизно 70 % (наприклад, щонайменше приблизно 77 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) залишків цистеїну, які відповідають Cys 59 людського I2S (SEQIDNO:1), перетворених у C α -формілгліцин (FGly). У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S згідно з цим винаходом містить практично 100 % залишків цистеїну, які відповідають Cys 59 людського I2S (SEQIDNO:1), перетворених у C α -формілгліцин (FGly).

Вміст сіалової кислоти

[00130] У деяких варіантах реалізації винаходу очищений рекомбінантний білок I2S можна охарактеризувати за композицією його сіалової кислоти. Не прив'язуючись до будь-якої конкретної теорії, вважається, що залишки сіалової кислоти в білках можуть запобігати, знижувати або пригнічувати швидке *invivo* виведення асіалоглікопротеїновими рецепторами, присутніми на гепатоцитах. Таким чином, вважається, що рекомбінантні білки, які мають відносно високий вміст сіалової кислоти, зазвичай характеризуються відносно тривалим часом циркуляції *invivo*.

[00131] У деяких варіантах реалізації винаходу вміст сіалової кислоти в очищеному рекомбінантному білку I2S можна визначити за допомогою добре відомих в цій галузі техніки способів. Наприклад, вміст сіалової кислоти в очищеному рекомбінантному білку I2S можна визначити за допомогою ферментного розщеплення і подальшого хроматографічного аналізу. Ферментне розщеплення можна проводити за допомогою придатної сіалідази. У деяких випадках розщеплення проводять ферментом глікозидгідролази, таким як нейрамінідаза. Сіалову кислоту можна детектувати за допомогою хроматографічного аналізу, такого як, наприклад, високоефективна аніонообмінна хроматографія з імпульсним амперометричним детектуванням (ВЕАОХ-ІАД). Кількість сіалової кислоти у композиції, що містить рекомбінантний I2S, можна розрахувати за допомогою стандартної кривої сіалової кислоти відповідно до відомих в цій галузі техніки і розкритих в цьому документі способів.

[00132] У деяких варіантах реалізації винаходу вміст сіалової кислоти в очищеному рекомбінантному білку I2S може бути більшим, ніж 16 моль/моль. У контексті сіалової кислоти одиниці "моль/моль" позначають кількість молей залишків сіалової кислоти, що припадають на один моль ферменту. У деяких випадках вміст сіалової кислоти в рекомбінантному білку I2S вище, ніж приблизно 16,5 моль/моль, приблизно 17 моль/моль, приблизно 18 моль/моль, приблизно 19 моль/моль, приблизно 20 моль/моль, приблизно 21 моль/моль, приблизно 22 моль/моль або більше. У деяких варіантах реалізації винаходу вміст сіалової кислоти в очищеному рекомбінантному білку I2S може відповідати діапазону приблизно 16-20 моль/моль, 16-21 моль/моль, приблизно 16-22 моль/моль, 16-23 моль/моль, 16-24 моль/моль, приблизно 16-25 моль/моль, приблизно 17-20 моль/моль, 17-21 моль/моль, приблизно 17-22 моль/моль, 17-23 моль/моль, 17-24 моль/моль або приблизно 17-25 моль/моль.

Фармацевтична композиція та введення

[00133] Очищений рекомбінантний білок I2S можна вводити пацієнтові з синдромом Хантера відповідно до відомих способів. Наприклад, очищений рекомбінантний білок I2S може бути доставлений внутрішньовенним, підшкірним, внутрішньом'язовим, парентеральним, трансдермальним або трансмукозальним (наприклад, оральним або назальним) шляхом.

[00134] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, вводять суб'єктові шляхом внутрішньовенного введення.

[00135] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, вводять суб'єктові шляхом інтратекального введення. Термін "інтратекальне введення" або "інтратекальна ін'єкція", який використовується в цьому документі, належить до ін'єкції в спинномозковий канал (інтратекальний простір, який оточує спинний мозок). Можна застосовувати різні способи, включаючи, без обмежень, латеральну церебровентрикулярну ін'єкцію через отвір бору або цистернальну або поперекову пункцію і так далі. У деяких варіантах реалізації винаходу "інтратекальне введення" або "інтратекальна доставка" згідно цього винаходу належить до ІТ введення або доставки через поперекову область або ділянку, тобто, поперекового ІТ введення або доставки. Термін "поперекова область" або "поперекова ділянка", який використовується в цьому документі, належить до області між третім і четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями та, точніше, до L2-S1 ділянці хребта.

[00136] У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, вводять суб'єктові шляхом підшкірного (тобто, під шкірний покрив) введення. В цьому випадку препарат можна ін'єктувати за допомогою шприца. При цьому доступні й інші пристрої для введення препарату, такі як пристрої для ін'єкції (наприклад, пристрої INJECT-EASE™ і GENJECT™); ручки-ін'єктори (такі як GenPen™); безголкові пристрої (наприклад, MediJector™ і BioJector™); та підшкірні системи доставки на основі пластиру.

[00137] У деяких варіантах реалізації винаходу можна застосовувати інтратекальне введення спільно з іншими способами введення (наприклад, внутрішньовенним, підшкірним, внутрішньом'язовим, парентеральним, трансдермальним або трансмукозальним (наприклад,

оральним або назальним)).

[00138] У цьому винаході передбачається як одноразове, так і багаторазове введення терапевтично ефективної кількості рекомбінантного I2S або фармацевтичної композиції, що його містить, описаних в цьому документі. Рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, можна вводити через регулярні інтервали залежно від природи, тяжкості та тривалості хворобливого стану суб'єкта (наприклад, лізосомній хвороби накопичення). У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, можна вводити періодично через регулярні інтервали (наприклад, раз на рік, раз на шість місяців, раз на п'ять місяців, раз на три місяці, кожні два місяці (раз на два місяці), щомісячно (раз на місяць), кожні два тижні (раз на два тижні), кожного тижня, щодня або постійно).

[00139] Рекомбінантний I2S або фармацевтичну композицію, що його містить, можна змішувати з фізіологічно прийнятним носієм або допоміжною речовиною для отримання фармацевтичної композиції. Носій та терапевтична речовина можуть бути стерильними. Препарат повинен відповідати способу введення.

[00140] Фармацевтично прийнятні придатні носії включають, але не обмежуються цим, сольові розчини (наприклад, NaCl), фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, спирти, гліцерол, етанол, гуміарабік, рослинні олії, бензилові спирти, поліетиленгліколі, желатин, вуглеводи, такі як лактозу, амілозу або крохмаль, цукри, такі як маніт, цукрозу або інші, декстрозу, стеарат магнію, тальк, кремнієву кислоту, вазелін, парфюмерну олію, ефіри жирних кислот, гідроксиметилцелюлозу, полівінілпіролідон і т. п., а також їх комбінації. Фармацевтичні препарати за необхідності можна змішувати з допоміжними речовинами (наприклад, лубрикантами, консервантами, стабілізаторами, змочуючими агентами, емульсифікаторами, солями для зміни осмотичного тиску, буферами, фарбниками, ароматизаторами та/або ароматичними речовинами і т. п.), які не вступають в небажані реакції з активними компонентами або не впливають на їх активність. У деяких варіантах реалізації винаходу застосовують водорозчинний носій, придатний для внутрішньовенного введення.

[00141] Композиція або лікарський препарат за необхідності може також містити невеликі кількості змочуючих та емульсуючих агентів або буферних агентів для зміни pH. Композиція може бути рідким розчином, суспензією, емульсією, пігулкою, пілюлею, капсулою, препаратом сповільненого вивільнення або порошком. Також композиція може бути виготовлений у вигляді суппозиторії з традиційними зв'язуючими речовинами і носіями, такими як тригліцериди. Препарат для перорального вживання може містити стандартні носії, такі як фармацевтичної ступіні чистоти маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, полівінілпіролідон, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію і так далі.

[00142] Композицію або лікарський препарат можна виготовити відповідно до стандартних процедур у вигляді фармацевтичної композиції, придатної для введення людям. Наприклад, в деяких варіантах реалізації винаходу композиція для внутрішньовенного введення зазвичай є розчином в стерильному ізотонічному водному буфері. За необхідності композиція також може містити розчинник та місцевий анестетик для зниження больових відчуттів в місці ін'єкції. У загальному випадку інгредієнти або додають окремо, або змішують разом в одиничній формі дозування, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритому контейнері, такому як ампула або пакет з вказівкою кількості активної речовини. Якщо композиція призначена для інфузійного введення, його можна розвести в інфузійному флаконі, що містить стерильну фармацевтичної ступіні чистоти воду, сольовий розчин або декстрозу/воду. Якщо композиція призначена для ін'єкційного введення, до нього може додаватися ампула зі стерильною водою для ін'єкції або сольовим розчином так, що інгредієнти можна змішувати перед введенням.

[00143] Термін "терапевтично ефективна кількість", який використовується в цьому документі, визначається, головним чином, на підставі загальної кількості терапевтичної речовини, що міститься у фармацевтичних композиціях згідно з цим винаходом. У загальному випадку терапевтично ефективної кількості вистачає, щоб досягти помітного позитивного ефекту для пацієнта (наприклад, лікування, модуляції, зцілення, запобігання та/або полегшення першопричинного захворювання або хворобливого стану). Наприклад, терапевтично ефективна кількість може бути кількістю, достатньою для досягнення необхідного терапевтичного та/або профілактичного ефекту, такого як кількість, достатня для модуляції лізосомних ферментних рецепторів або їх активності, яка призводить до лікування лізосомної хвороби накопичення або її симптомів (наприклад, зниженню або виключенню появи "пінистих клітин" або клітинної вакуолізації після введення суб'єктові композицій згідно з цим винаходом). У загальному випадку кількість терапевтичної речовини (тобто, рекомбінантного лізосомного ферменту), що

вводиться суб'єктові, який потребує цього, залежить від характеристик суб'єкта. Такі характеристики включають хворобливий стан, тяжкість захворювання, загальний стан здоров'я, вік, стать і масу тіла суб'єкта. Для фахівця в цій галузі техніки не важко буде визначити відповідні дозування залежно від цих та інших чинників. Додатково, для визначення оптимальних діапазонів дозувань можна застосовувати як об'єктивний, так і суб'єктивний аналіз.

[00144] Терапевтично ефективну кількість зазвичай вводять в режимі дозування, який може включати множинне дозування. Терапевтично ефективна кількість (та/або відповідне одиничне дозування в межах ефективного режиму дозування) може варіюватися для кожного конкретного терапевтичного білку, наприклад, залежно від способу введення або від комбінування з іншими фармацевтичними речовинами. Також певна терапевтично ефективна кількість (та/або одиничне дозування) у випадку кожного конкретного пацієнта може залежати від безлічі чинників, включаючи порушення, лікування якого проводиться, і ступінь тяжкості цього порушення; активність визначеної фармацевтичної речовини, яка застосовується; визначена композиція, яка застосовується; вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать і спосіб харчування пацієнта; час введення, спосіб введення та/або швидкість виведення або метаболізму певного злитого білку, що застосовується; тривалість лікування; і тому подібні чинники, які добре відомі в галузях техніки медицини.

[00145] Додаткові типові фармацевтичні композиції та способи введення описані в публікації згідно РСТ WO2011/163649 під назвою "Способи і композиції для ЦНС доставки ідуронат-2-сульфатази" та попередній заявці № 61/618,638 під назвою "Підшкірне введення ідуронат-2-сульфатази", поданої на реєстрацію 30 березня 2012 р., повний зміст яких включений в цей документ в якості посилання.

[00146] Також слід розуміти, що у випадку кожного конкретного суб'єкта відповідні режими дозування мають бути з часом погоджені відповідно до індивідуальних вимог і професійної оцінки фахівця, який здійснює застосування або контролює застосування ферментозамісної терапії, а наведені в цьому документі діапазони дозувань є лише прикладами та не обмежують об'єму або практичної реалізації винаходу, який заявляється.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Захоплення та процес очищення рекомбінантного I2SAF

[00147] У цьому прикладі наведено спрощений процес прямого очищення, який можна застосовувати для захоплення та очищення рекомбінантного I2S, що виробляється в безсироватковому середовищі. Типова схема очищення проілюстрована на Фігурі 1.

[00148] Розробляли клітинну лінію, стабільно експресуючу фермент ідуронат-2-сульфатази (I2S) та формілгліцин-утворюючий фермент (FGE). Генерація та характеристики типових клітинних ліній описані в попередній заявці на патент США під назвою "Клітини для отримання рекомбінантної ідуронат-2-сульфатази", поданої на реєстрацію одночасно з цим документом, повний зміст якої включено в цей документ шляхом посилання. Коротко, людську клітинну лінію сконструювали для коекспресії людського білку I2S з амінокислотою послідовністю, наведеною в SEQ ID NO:2, і людського формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE) з амінокислотою послідовністю, наведеною в SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:2

> Повнорозмірний попередник ідуронат-2-сульфатази

MPPPRTRGRLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLA
SHSLLFQNAFAQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVG
KVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSSEKYENTKTCTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGLPDPKQS
TEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDI
RQREDVQALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAL
GEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDELVELVSL
FPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVLCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQ
WNSDKPSLKDIIKMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQG
GDLFQLLMP

SEQ ID NO:5

Повнорозмірний попередник людського FGE:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAA
AHRYREANAPGPVGERQLAHSKMVPVAGVFTMGTDTPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVS
NTEFEKFNSTGYLAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAFAAAPPWWLPVKGANWRHPEGPSTI
LHRPDHPVLHVSWNDVAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGLHNRLFPWGNKLPKGGQHYANIWQ
GEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPPNGYGLYNIVGNWWEWTSWWTVHHHSVEETLNPKGPPSGKDR
VKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

[00149] Після синтезу повнорозмірного ферменту I2S видаляли 25-амінокислотний

сигнальний пептид, після чого розчинний зрілий фермент I2S секретувався з клітини.

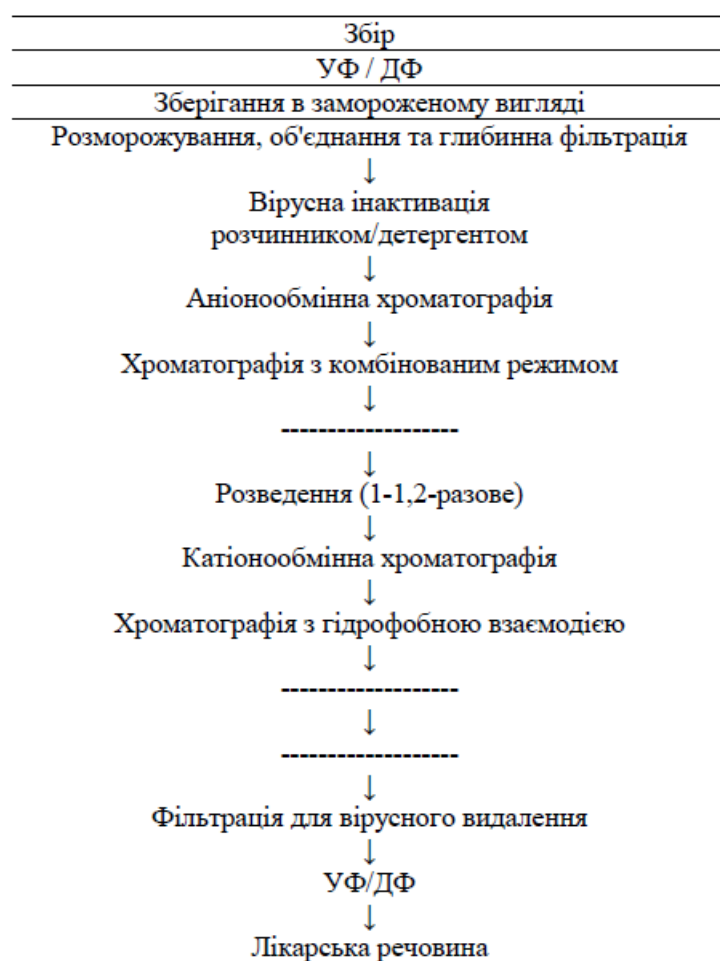
[00150] В процесі, що проходить в біореакторі, застосовували хімічно визначене середовище (що не містить сироватку/що не містить компоненти тваринного походження; AF).

5 [00151] Кожний індивідуальний матеріал для збору зменшували в обсязі та проводили заміну буферу за допомогою процесу ультрафільтрації/діафільтрації. Кожний окремий збір матеріалу, що називається неочищеною масою (НМ), заморожували при -50°C. Процес прямого очищення починався з розморожування та об'єднання неочищеної маси і включав успішну вірусну інактивацію, етапи аніонообмінної хроматографії (Capto Q), хроматографії з комбінованим режимом (керамічний гідроксиапатит), катіонообмінної хроматографії (SP-сефароза) та хроматографії з гідрофобною взаємодією (феніл сефароза) з подальшою вірусною фільтрацією та етапом кінцевої концентрації та діафільтрації. Зокрема, в даному процесі очищення застосовували хроматографічні способи із застосуванням Q, гідроксиапатиту, SP та фенілу. Хроматографію з протеїном G і ексклюзійну хроматографію, що традиційно застосовуються в процесі очищення I2S, опускали. Типові етапи наведені в Таблиці 3.

15

Таблиця 3

Типові етапи процесу очищення



20 [00152] Ступінь очищення очищеного білка I2S оцінювали за допомогою пептидного картування, ДСН-ПААГ (зі сріблом), ексклюзійної ВЕРХ. Специфічну ферментативну активність, вміст формілгліцину, вміст сілової кислоти, карту гліканів, профілі зарядів визначали за допомогою стандартних способів. Типові результати наведені в Таблиці 4.

Таблиця 4

Аналіз очищеного рекомбінантного білка I2S

Метод аналізу		Очищений I2S (10 л об'єм) Мін-Макс (n)
Пептидне картування	L1	100-105% (n = 3)
	L10	98-100% (n = 3)
	L12	102-102% (n = 3)
	L13	96-97% (n = 3)
	L14	102-103% (n = 3)
	L17	101-101% (n = 3)
	L20	102-103% (n = 3)
Блок клітини- хазяїна		≤62,5 (n = 5)
ДСН-ПААГ (зі сріблом)		Відповідає
Іонообмінна ВЕРХ	% Пік А	69-69% (n = 2)
	% Пік В	20-21% (n = 2)
	% Пік E+F	10-11% (n = 2)
Ексклюзивна ВЕРХ		99,9-99,9% (n = 5)
Клітинне поглинання (біоаналіз)		85,95% та 97% (n = 3)
% формілгліцину		87-95% (n = 5)
Специфічна активність		62-78 (n = 5)
Карта гліканів	Пк грп 3	88-93% (n = 5)
	Пк грп 5	72-110% (n = 5)
	Пк грп 6	124-133% (n = 5)
	Пк грп 7	78-87% (n = 5)
	Загальна площа	94-116% (n = 5)
Сіалова кислота		16-22 (n = 4)
Ендотоксин		<0,04-<0,05 (n = 2)
Біонавантаження		0,00-0,00 (n = 2)

[00153] Типова пептидна карта у порівнянні з комерційно доступним контрольним зразком I2S проілюстрована на Фігурі 2. Результати типового ДСН-ПААГ-аналізу (зі сріблом) проілюстровані на Фігурі 3. Як правило, при застосуванні описаного в цьому документі способу, концентрація БКХ в лікарському речовині (ЛР) становила <100 м.д., що задовольняє технічній вимозі <100 м.д., загальноприйнятій на багатьох ринках, включаючи США. Результат ЕХ для ЛР становив ≥99,5 %, який також задовольняє загальноприйнятій на сьогоднішній день на багатьох ринках технічній вимозі >99,3 %. Типовий профіль заряду проілюстрований на Фігурі 4.

Типова карта гліканів проілюстрована на Фігурі 5. Зокрема, карта гліканів для очищеного I2S містить сім груп піків, які елюються відповідно до збільшення кількості негативних зарядів, отриманих із залишків сіалової кислоти та манозо-6-фосфату, і представлених у порядку елювання: нейтральні, моно-, дисіалювані, монофосфорильовані, трисіалювані та гібридні (моносіалювані та блоковані М6Р), тетрасіалювані та гібридні (дисіалювані та блоковані М6Р) та дифосфорильовані глікани.

[00154] В цілому, цей приклад демонструє, що спрощений чотирьохколонковий спосіб очищення можна успішно застосовувати для очищення рекомбінантного I2S, що виробляється у

промислових масштабах у середовищі, що не містить тваринних компонентів.

Приклад 2. Дослідження стабільності збору та вірусної інактивації рекомбінантного I2SAF

[00155] Метою цього дослідження була оцінка впливу вмісту при заданій температурі та циклів заморожування-розморожування на стабільність освітленого збору рекомбінантного I2S.

5 [00156] Зразки освітленого збору зберігали в умовах зовнішнього середовища та при 2-8 °C до семи діб, а вірусно-інактивовані зразки НМ містили в умовах зовнішнього середовища до 24 годин. Зразки освітленого збору для заморожування-розморожування заморожували при -20 °C, -50 °C та -80 °C та проводили до трьох циклів заморожування-розморожування. Стабільність оцінювали за допомогою Вестерн-блотинга, EX BEPX та аналізу активності.

10 [00157] Матеріал для збору I2S-AF отримували з клітинної лінії 2D за допомогою CCPD із застосуванням 20 л біореактору В. Браун з центрифужним ретенційним пристроєм та заданою швидкістю потоків. Для дослідження вмісту зразків при заданій температурі кожний освітлений збір зберігали в умовах зовнішнього середовища при 2-8 °C та брали зразки в обрані моменти часу. Кількісні характеристики зразків та час збору зразків наведені в Таблиці 5. Зразки для
15 заморожування-розморожування зберігали при -20 °C, -50 °C та -80 °C і розморожували за допомогою водяної бані при 25 °C.

Таблиця 5

Стабільність освітленого збору в задані часові точки

	Зразки	Температура вмісту	Час утримання (діб)
Освітлений збір 12	15 × 0,5 мл	2-8 °C	T=0, 24 год., 76 год., 120 год., 168 год.
	15 × 0,5 мл	Зовнішнього середовища	T=0, 24 год., 76 год., 120 год., 168 год.
	9 × 0,5 мл	-20°C, -50°C та -80°C	Заморожування / розморожування 1, 2 та 3
Освітлений збір 18	15 × 0,5 мл	2-8 °C	T=0, 24 год., 76 год., 120 год., 168 год.
	15 × 0,5 мл	Зовнішнього середовища	T=0, 24 год., 76 год., 120 год., 168 год.
	9 × 0,5 мл	-20 °C, -50 °C та -80 °C	Заморожування / розморожування 1, 2 та 3

20 [00158] Етап вірусної інактивації відбувався на етапі, що включає неочищену масу, до завантаження першої колонки. НМ отримували за допомогою концентрації та заміни буферу освітленого збору. УФ/ДФ проводили за допомогою системи Pall Centramate 1 кв. фут., а буфер міняли на 10 мм MEM, 155 мм NaCl, pH=6,5. На етапі вірусної інактивації проводили додавання 1 % Твін 80 та 0,3 % ТпВР і фільтрацію за допомогою шприцевих фільтрів Dugrope для кожної
25 часової точки. Зразки брали для кожної часової точки з перерахованих в Таблиці 6 та заморожували при -80 °C. Зразки з досліджень освітленого збору в задані часові точки та досліджень із заморожування-розморожуванням досліджували за допомогою Вестерн-блотингу та аналізу активності (аналізу з 4-MU). Ступінь очищення зразків НМ на етапі вірусної інактивації визначали за допомогою EX BEPX. У результатах, що відображають активність в
30 заданій часовій точці, для Збору 12 і Збору 18, наведених у Таблиці 5, не спостерігали значних змін при утриманні їх протягом 7 діб в умовах зовнішнього середовища та при 2-8 °C. В активності, реєстрованої для Збору 12, не спостерігали помітних змін після 3 циклів заморожування-розморожування і зберігання при -20 °C, -50 °C і -80 °C.

Таблиця 6

Вірусна інактивація неочищеної маси

	Зразки	Температура вмісту	Час утримання (діб)
Вірусна інактивація	9 × 0,5 мл	Зовнішнього середовища, контроль	T=0, 6 год., 24 год.
	9 × 0,5 мл	Зовнішнього середовища, вірусна інактивація	T=0, 6 год., 24 год.

[00159]

5 [00160] Активність та результати EX-BEPX для стабільності на етапі вірусної інактивації НМ проілюстровані на Фігурах 6 і 7. На базі даних активності та ступеню очищення на протязі 24 годин показано, що в стабільності вірусної інактивації не було змін.

10 [00161] Підводячи підсумок, можна сказати, що за результатами описаного в цьому документі аналізу стабільності, освітлений збір можна зберігати при 2-8 °C (наприклад, на протязі 7 діб) без значних змін якості збору. Освітлені збори можна піддавати багаторазовим циклам заморожування-розморожування та зберігати при температурі -20 °C, -50 °C і -80 °C без значних змін в стабільності. На базі отриманих за допомогою EX BEPX результатів за ступенем очищення можна сказати, що вірусна інактивація на етапі НМ може відбуватися при температурі навколишнього середовища (наприклад, протягом 24 годин) без змін в активності і ступеню очищення.

15 Приклад 3. Проведення очищення та аналізу середовища IL CD, щоне містить тваринних компонентів

[00162] Метою цього дослідження було проведення очищення об'єднаного збору I2S-AF, отриманого з хімічно визначеного середовища, що не містить тваринних компонентів, із застосуванням перфузії та отримання характеристик лікарської речовини.

20 [00163] У цьому дослідженні оцінювали спосіб проведення очищення I2S-AF і лікарської речовини (ЛР), отриманих за допомогою біореактора, що містить хімічно визначене середовище.

Клітинна культура

25 [00164] Матеріал I2S-AF отримували з клітинної лінії 2D, експресуючої фермент I2Sta формілгліцин-утворюючий фермент (FGE), як описано в Прикладі 1. Матеріал отримували в CCPD в 1 л біореакторі з відцентровим фільтром Das Gip із застосуванням хімічно визначеного безсироваткового середовища. Окремі мішки з кожним освітленим збором (HI-21) брали замороженими при -20 °C та розморожували при 2-8 °C протягом ночі. Однакові об'єми кожного очищеного збору об'єднували для того, щоб отримати пул повного збору, потім фільтрували із застосуванням 0,2 мкм фільтру та концентрували за допомогою 30 кД касети Pall Omega Centramate із загальною площею мембрани 1 фут². Неочищену масу (НМ) перед застосуванням фільтрували із застосуванням 0,2 мкм фільтру та заморожували.

Очищення

35 [00165] Типові характеристики колонки і завантаження наведені в Таблиці 7. Q сефарозу завантажували при заданого титру 3 г/л. Наступні колонки завантажували на 100 % відносно елюату з попередніх колонок, не видаляючи матеріал.

Таблиця 7

Характеристики колонок та завантаження

Колонка	Розміри колонки (см x см)	Об'єм колонки (мл)	Завантаження колонки (г/л смоли I2S)	Завантаження колонки (мг)
Q сефароза	2,6 × 25	133	3	399
HA типу II, 80 мкм	1,6 × 30	60	5,5	330
Феніл сефароза	1,6 × 23	46	5,6	258

40 [00166] Одне очищення проводили для НМ з об'єднаних зборів 1-21 з біореактора. НМ розморожували при 2-8 °C протягом ночі та об'єднували однакові об'єми, взяті з кожного збору.

[00167] Окремі етапи колонкового процесу та состави буферів наведені в таблиці 8-11.

Об'єднану НМ фільтрували за допомогою системи пляшкових 0,2 мкм фільтрів, доводили до рН 6,5 за допомогою 1 М ацетату натрію, а провідність доводили до 16 мсм/см за допомогою 5 М хлориду натрію перед завантаженням у колонку з Qсефарозою FF. Елюат Qсефарози доводили до 0,001 М NaPO₄ за допомогою 0,25 М NaPO₄, рН 5,5, і фільтрували за допомогою 0,22 мкм пляшкового фільтру з PES мембраною перед завантаженням у НА-колонку. Провідність елюату НА доводили до 1,55 М NaCl за допомогою 5 М NaCl, а рН доводили до рН 5,5 за допомогою 1 М ацетату натрію. Час доведення становив приблизно 1 годину. Доведений пул фільтрували за допомогою 0,22 мкм пляшкового фільтру з PES мембраною перед завантаженням у колонку з фенол сефарозою. Феніл-елюат концентрували 4X та діалізували 6X у 0,02 М NaPO₄, 0,137 М NaCl, рН 6,0. Діалізований продукт доводили до 2,0 г/л та змішували з 0,2 % полісорбатом 20, щоб отримати пробну лікарську речовину. Для отримання додаткових характеристик створювали пробний пул Н1-20 з НМ.

Таблиця 8

Типові технічні деталі для хроматографії з Qсефарозою FF

Етап процесу	Швидкість потоку (см/год.)	ОК	Буфери
Санація	150	3	0,5 N NaOH
Врівноваження	150	4	0,01 M MEM, 0,155 M NaCl, pH 6,5
Відмивання 1	150	2	0,01 M MEM, 0,155 M NaCl, pH 6,5
Відмивання 2	150	3	0,01 M MEM, 0,155 M NaCl, pH 5,5
Елюювання	150	3	0,01 M MEM, 0,50 M NaCl, pH 5,5
Очищення /Зняття	150	4	1,0 M NaOH, 2 M NaCl
Зберігання	150	4	0 0 N NaOH

Таблиця 9

Типові технічні деталі для НА-хроматографії

Етап процесу	Швидкість потоку (см/год.)	ОК	Буфери
Санація	200	3	0,5 N NaOH
Врівноваження	200	3	0,250 M NaPO ₄ , pH 5,5
Відмивання 1	200	3-6	0,01M MEM, 0,001M NaPO ₄ , 0,5M NaCl, pH 5,5
Відмивання 2	200	1	0,01M MEM, 0,001M NaPO ₄ , 0,5M NaCl, pH 5,5
Елюювання	200	6	0,01M MEM, 0,01M NaPO ₄ , 0,5M NaCl, pH 5,5
Санація	200	3	0,01M MEM, 0,08M NaPO ₄ , pH 5,5
Зняття	200	4	0,4M NaPO ₄ pH 12
Очищення	200	4	0,5 N NaOH
Зберігання	200	4	0,1 N NaOH

15

Таблиця 10

Типові технічні деталі для хроматографії з феніл сефарозою

Етап процесу	Швидкість потоку (см/год.)	ОК	Буфери
Санація	150	3	0,5 N NaOH
Врівноваження	150	4-6	0,02 M MEM, 1,5 M NaCl, pH 5,5
Відмивання	150	2	0,02 M MEM, 1,5 M NaCl, pH 5,5
Елюювання	150	3	0,02 M MEM, 0,2 M NaCl, pH 5,5
Відмивання водою	150	3	RO/DI Вода
Відмивання етанолом	150	3	20 % Етанол
Очищення	150	3	0,5 N NaOH
Зберігання	150	3	0,01 N NaOH

Таблиця 11

Типова діафільтрація феніл-елюційного пулу

Фільтраційний пристрій	Centricon Plus 70
Діафільтраційний буфер	0,02 M NaPO ₄ , 0,137 M NaCl, pH 6,0
Об'єми діафільтрації	6X-8X

- 5 Ступінь очищення в ході процесу, що визначається за БКХ за допомогою ELISA [00168] У Таблиці 12 наведені дані по видаленню БКХ на кожному етапі в ході процесу. Результати по видаленню БКХ в ході процесу були високими, а найбільше видалення відбувалося на етапі НА.

Таблиця 12

Дані по видаленню БКХ в ході процесу

Етап	БКХ (нг/мг)	ЛРВ	Кратність БКХ
Q	46,392	0,3	2
	51,957		
НА	51,957	1,3	18
	5,876		
Феніл	5,876	0,7	5
	1,870		

- 10 Характеристики лікарської речовини
[00169] Результати для типової партії лікарської речовини наведені в Таблиці 13. Як можна бачити, в очищеному матеріалі лікарська речовина має високу специфічну активність та %ФГ. Типові характеристики лікарської речовини наведені в Таблиці 13. Вміст БКХ було зменшено від 1870 нг/мг до 372 нг/мг на кінцевому УФ/ДФ етапі.

15

Таблиця 13

Типова партія лікарської речовини

Партія ЛР	1 л CD середовища (I2S-AF)
% ФГ	94 %
Карта гліканів	
Група 3	99 %
Група 5	89 %
Група 6	104 %
Група 7 (2-M6P)	95 %
Загальна площа	107 %
Сіалова кислота	17
Інтерналізація	83 %
EX-BEPX	99, 9 %
Специфічна активність (Од/мг)	82
Ю ВЕРХ	
A (%)	64 %
B (%)	23 %
A+B	87 %
E+F	0 %
Білок клітини- хазяїна	372
Клітинне поглинання	98

Приклад 4. Фізико-хімічні та біологічні характеристики рекомбінантного ферменту I2S

- 5 [00170] Метою даного прикладу було отримання детальних характеристик рекомбінантного білка I2S, очищеного вищеописаними способами.

ДСН-ПААГ

- 10 [00171] Для даного експерименту рекомбінантний білок отримували, застосовуючи людські клітинні лінії 2D та 4D у двох окремих безсироваткових клітинних культуральних реакціях. Зразки збирали та очищали за допомогою вищеописаних способів. Очищений фермент I2S аналізували за допомогою ДСН-ПААГ та обробляли срібним барвником для візуалізації. Типові результати проілюстровані на Фігурі 8. Як видно з Фігури 8, схеми смуг для рекомбінантного білка I2S, очищеного вищеописаними способами, можна порівняти з контрольним зразком I2S, очищеним стандартним способом.

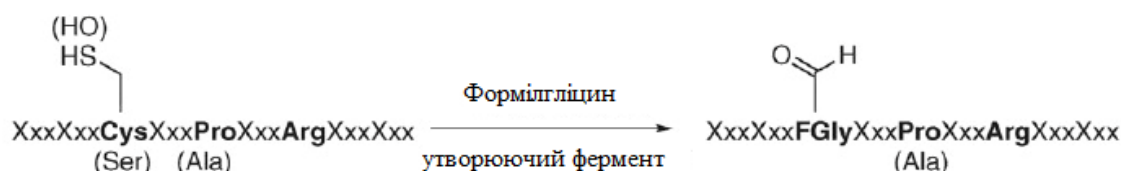
Пептидна карта

- 15 [00172] Рекомбінантний білок I2S, отриманий з клітинної лінії I2S-AF 2D, очищали за допомогою вищеописаних способів. Зразок очищеного рекомбінантного I2S і контрольний зразок людського I2S піддавали протеолітичному розщепленню і досліджували за допомогою ВЕРХ-аналізу. Типова пептидна карта в порівнянні з відповідною картою для контрольного I2S проілюстрована на Фігурі 9.

- 20 Відсоток конверсії у формілгліцин

[00173] Для визначення відсотка FGly-конверсії можна застосовувати пептидне картирування. Для активації I2S необхідна конверсія цистеїну (відповідної позиції 59 зрілого людського I2S) у формілгліцин за допомогою формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE) як показано нижче:

25



Отже, відсоток конверсії у формілгліцин (%ФГ) можна розрахувати, використовуючи наступну формулу:

30

$$\% \text{ФГ (I2S)} = \frac{\text{Кількість активних молекул I2S}}{\text{Загальна кількість (активних+неактивних) молекул I2S}} \times 100$$

[00174] Наприклад, 50 % ФГ означає те, що половина очищеного рекомбінантного I2S ферментативно неактивна та не надає терапевтичного ефекту.

[00175] Для розрахунку %ФГ застосовували пептидне картування. Коротко, очищений рекомбінантний білок I2S розщеплювали на короткі пептиди за допомогою протеаз (наприклад, трипсину або хімотрипсину). Короткі пептиди розділяли та отримували їх характеристики за допомогою HPLC. Пептид, до складу якого входить позиція, відповідна позиції 59 зрілого людського I2S, вибирали, щоб визначити, чи був Cys у позиції 59 перетворений у FGly, в порівнянні з контролем (наприклад, білком I2S без конверсії у FGly або білком I2S з 100 % конверсією у FGly). На підставі відповідних пікових площ можна визначити кількість пептидів, що містять FGly (відповідну кількість активних молекул I2S), та загальну кількість пептидів, що містять FGly та Cys (відповідну загальну кількість молекул I2S), і розрахувати співвідношення, що відображає %ФГ. Типові результати наведені в Таблиці 14.

Карта гліканів - вміст манозо-6-фосфату та сілової кислоти

[00176] Проводили визначення складу гліканів та сілової кислоти для очищеного рекомбінантного білку I2S. Кількісну оцінку складу гліканів проводили за допомогою аніонообмінної хроматографії. Як описано нижче, карта гліканів рекомбінантного I2S, очищеного в умовах, що описуються в цьому документі, складається з семи пікових груп, які елюються відповідно до росту кількості негативних зарядів, щонайменше частково належать глікоформам сілової кислоти та манозо-6-фосфату, отриманих в результаті ферментного розщеплювання. Коротко, очищений рекомбінантний I2S з безсироваткової клітинної культури (безсироваткова I2S-AF 2D та безсироваткова I2S-AF 4D), та контрольний рекомбінантний I2S обробляли (1) очищеним ферментом нейрамінідазою (виділеною з *Arthrobacter Ureafaciens* (10 мЕ/мкл), Roche Biochemical (Індіанаполіс, Індіана), Cat. # 269 611 (1 Е/100 мкл)) для видалення залишків сілової кислоти, (2) алкалінофосфатазою на протязі 2 годин при 37±1 °С для повного вивільнення залишків манозо-6-фосфату, (3) алкалінофосфатазою + нейрамінідазою або (4) не проводили обробку. Кожне ферментативне розщеплювання аналізували за допомогою високоефективної аніонообмінної хроматографії з імпульсним амперометричним детектуванням (HPLC-PAD), використовуючи аналітичну колонку CarboPac PA1 Analytical Column з передколону Dіonex CarboPac PA1. У кожному аналізі використовували еталонні групи сілової кислоти та манозо-6-фосфату в діапазоні, що становить від 4,0 до 2,0 нмоль. Застосовували ізократичний спосіб із застосуванням 48 мм ацетату натрію в 100 мм гідроксиду натрію на протязі як мінімум 15 хвилин при швидкості потоку 1,0 мл/хв при зовнішній температурі колонки для елювання кожного піку. Дані, отримані для кожного окремого етапу для зразків I2S-AF та контрольного I2S, об'єднували на одній хроматограмі, щоб отримати карту гліканів для кожного відповідного рекомбінантного білку. Як проілюстровано на Фігурі 10, на типовій карті гліканів для I2S, очищеного з безсироваткового середовища, представлені типові елюційні піки (в порядку елювання), відповідні нейтральним, моно-, дисіальованим, монофосфорильованим, трисіальованим та гібридним (моносіальованим та кепованому манозо-6-фосфату), тетрасіальованим та гібридним (дисіальованим та кепованому манозо-6-фосфату) та дифосфорильованим гліканам. Типові карти гліканів проілюстровані на Фігурі 10.

[00177] Середній вміст сілової кислоти (кількість молей сілової кислоти, що припадає на один моль білку) для кожного зразка рекомбінантного I2S розраховували з лінійно-регресійного аналізу стандартних значень для сілової кислоти. Кожну отриману хроматограму візуалізовували за допомогою програмного забезпечення PeakNet 6. Стандартні значення для сілової кислоти, значення для сілової кислоти, виділеної з контрольного рекомбінантного I2S та досліджуваних зразків, знаходяться в одному піку. Кількість сілової кислоти (у нмоль) для I2S розраховували як вихідну величину за допомогою наступної формули:

$$C.K. \text{ (молей на моль I2S)} = \frac{\text{(нмоль сілової кислоти)}}{(0,3272)(C)}$$

Де C - концентрація білку (в мг/мл) у зразку або контрольному зразку рекомбінантного I2S.

Скореговану величину для сілової кислоти в молях сілової кислоти на один моль білку для кожного досліджуваного зразка розраховували, застосовуючи наступну формулу:

$$\text{Скореговане значення для С.К.} = \frac{\left(\frac{\text{Вихідне значення для сіалової кислоти}}{\text{Встановлене значення для ідурсульфазу}} \right) \times \left(\frac{\text{Вихідне значення для ідурсульфазу}}{\text{Встановлене значення для ідурсульфазу}} \right)}$$

5 [00178] Типові дані, що представляють вміст сіалової кислоти в рекомбінантному I2S, очищеному з клітинних ліній I2S-AF 2D або 4D, наведені в Таблиці 14.

Таблиця 14

Типові характеристики рекомбінантного I2S,
очищеного з безсироваткової клітинної культури

Аналіз	I2S-AF 2D (Безсироваткова)
Пептидне картування	
L1	101
L10	100
L12	102
L13	97
L14	101
L17	100
L20	102
Білок клітини-хазяїна	< 62,5 нг/мг
Іонообмінна ВЕРХ% Площа	
Пік А	62
Пік А+В	82
Пік Е+F	0
% Формілгліцину	87
Специфічна активність (Од/мг) (аналіз виділення сульфату)	64
% Ексклюзійна ВЕРХ	≥ 99,8(n=13)
Картування гліканів	
Моносіаловані	105
Дисіаловані	93
Монофосфорильовані	139
Трисіаловані	89
Тетрасіаловані	125
Дифосфорильовані	95
Сіалова кислота (моль/моль)	20

Специфічна активність

10 [00179] Специфічну активність рекомбінантного ферменту I2S, очищеного описаними в цьому документі способами, аналізували за допомогою in vitro аналізу виділення сульфату або аналізу з 4 MUF.

In vitro аналіз виділення сульфату

15 [00180] In vitro аналіз активності виділення сульфату проводили, застосовуючи в якості субстрату гепарин дисахарид. Зокрема, в цьому способі визначають здатність I2S вивільняти сульфат-іони з субстрату природного походження - гепарин дисахариду. Кількість вивільненого сульфату можна визначити за допомогою іонної хроматографії із застосуванням детекторів провідності. Коротко, спочатку зразкам замінювали буфер на 10 мм ацетату Na, pH 6, для усунення пригнічення фосфат-іонами в буферній суміші. Потім зразки розводили до 0,075 мг/мл реакційним буфером (10 мм ацетату Na, pH 4,4) і інкубували протягом 2 год. при 37 °C з гепарин дисахаридом при співвідношенні ферменту та субстрату, відповідному 0,3 мкг I2S/100 мкг субстрату, в 30 мкл реакційному обсязі. Потім реакцію зупиняли шляхом нагрівання зразків при 100 °C на потязі 3 хв. Аналіз проводили, застосовуючи аналітичну колонку Dionex IonPac

AS18 з передколонкою IonPac AG18. Застосовували ізократичний метод з 30 мм гідроксиду калію при 1,0 мл/хв на протязі 15 хвилин. Кількість сульфату, вивільненого зразком I2S, розраховували, застосовуючи лінійно-регресійний аналіз сульфатних проб в діапазоні від 1,7 до 16,0 нмоль. Фіксовану величину виражали в одиницях на мг білку, де 1 одиниця відповідає 1

5

мкмоль сульфату, що виділяється на годину, а концентрацію білку визначали за допомогою вимірювань A280. Типові результати наведені в Таблиці 14.

Аналіз з 4 MUF

[00181] Специфічну активність рекомбінантного ферменту I2S також можна аналізувати за допомогою флуоресцентного аналізу з 4 MUF. Коротко, в цьому аналізі оцінюють гідроліз субстрату I2S-4-метилумбеліферил-сульфату (4-MUF-SO₄). Після розщеплення субстрату 4-MUF-SO₄I2S молекула перетворюється в сульфат та природний флуоресцентний 4-метилумбеліферил (4-MUF). В результаті ферментативну активність I2S можна визначити, оцінюючи загальну зміну флуоресцентного сигналу з часом. В цьому експерименті очищений білок I2S інкубували з розчином 4-метилумбеліферил-сульфату (4-MUF-SO₄), сіллю калію, Sigma Cat. # M-7133). Калібрування в цьому аналізі проводили, використовуючи групи контрольних зразків, що містять комерційно доступний фермент I2S, розведений в матковому розчині у співвідношенні 1:100, 1:200 та 1:20000. Ферментний аналіз проводили при 37 °C за допомогою відкаліброваного флуорометру. Використовуючи значення флуоресценції, отримані для кожного еталонного зразка, відсотковий коефіцієнт варіації визначали за допомогою наступного виразу:

10

15

20

$$\%KB = \frac{\text{Стандартне відхилення вихідного значення флуоресценції (N = 3)}}{\text{Середнє значення флуоресценції}} \times 100\%$$

[00182] Потім відсоткові значення KB застосовували для розрахунку скорегованого середньої флуоресценції для кожного зразка для того, щоб визначити реестровану ферментативну активність, яка виражається в МЕ/мл, за допомогою наступної формули:

25

$$ME / mL = (SEF) \left(\frac{1 \text{ нмоль} / L}{10 \text{ ЕФ}} \right) \left(\frac{1L}{10^3 \text{ мл}} \right) \left(\frac{2,11 \text{ мл}}{0,01 \text{ мл}} \right) \left(\frac{1 \text{ год}}{60 \text{ хв}} \right) \left(\frac{1 \text{ мОд}}{\text{нмоль}} \right) (KP)$$

30

СЕФ = негативна скорегована середня флуоресценція

КР - кратність розведення

[00183] Одна міліодиниця активності відповідає кількості ферменту, необхідного для перетворення одного наномолю 4-метилумбеліферил-сульфату у 4-метилумбеліферил на одну хвилину при 37 °C.

35

Профіль заряду

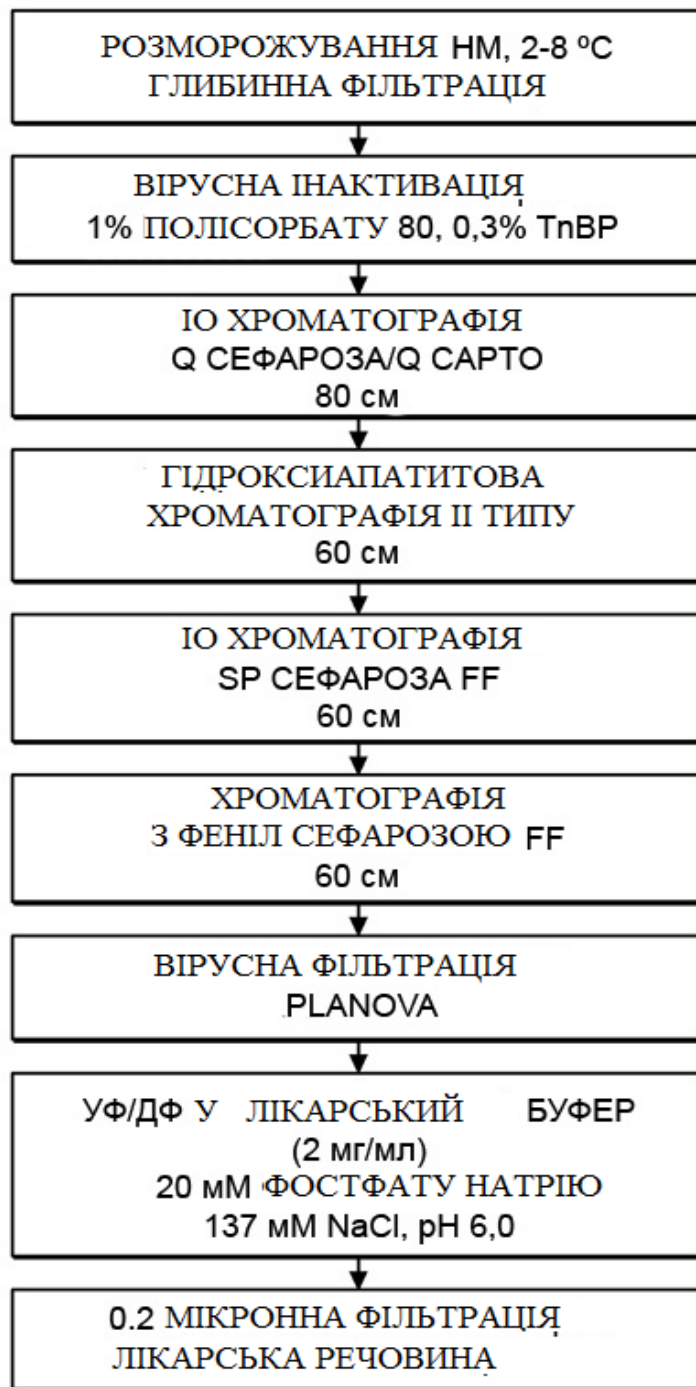
[00184] У цьому експерименті визначали розподіл заряду для кожного очищеного рекомбінантного I2S за допомогою сильної аніонообмінної хроматографії (САХ), застосовуючи систему для вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). У даному способі варіанти рекомбінантного I2S у зразку поділяють на підставі відмінностей в поверхневих зарядах. При значенні рН 8,00 негативно заряджені групи адсорбуються на фіксованому позитивному заряді САХ-колони. Для того, щоб елювати кожну групу білків пропорційно силі їх іонної взаємодії з колонкою застосовують градієнт зростаючої іонної сили. Сто мікрограмів очищеного I2S, виділеного з клітинної лінії 2D у безсироваткових умовах росту, або контрольний рекомбінантний фермент I2S завантажували в колонку Amersham Biosciences MiniQPE (4,6 × 50 мм), яку тримали при температурі навколишнього середовища, таурівнювали 20 мм Трис-НС1, рН 8,00. Градієнтне елювання здійснювали за швидкості потоку 0,80 мл/хв, застосовуючи рухому фазу 20 мм Трис-НС1, 1,0 М хлориду натрію, рН 8,00. Концентрацію білку визначали безперервно в ході експерименту, вимірюючи поглинання світла зразка, який елюється, на довжині хвилі 280 нм. Типові результати, ілюструючі профілі зарядів, які спостерігали для рекомбінантного I2S, виділеного з клітинних ліній 2D та 4 D, наведені на Фігурі 11.

50

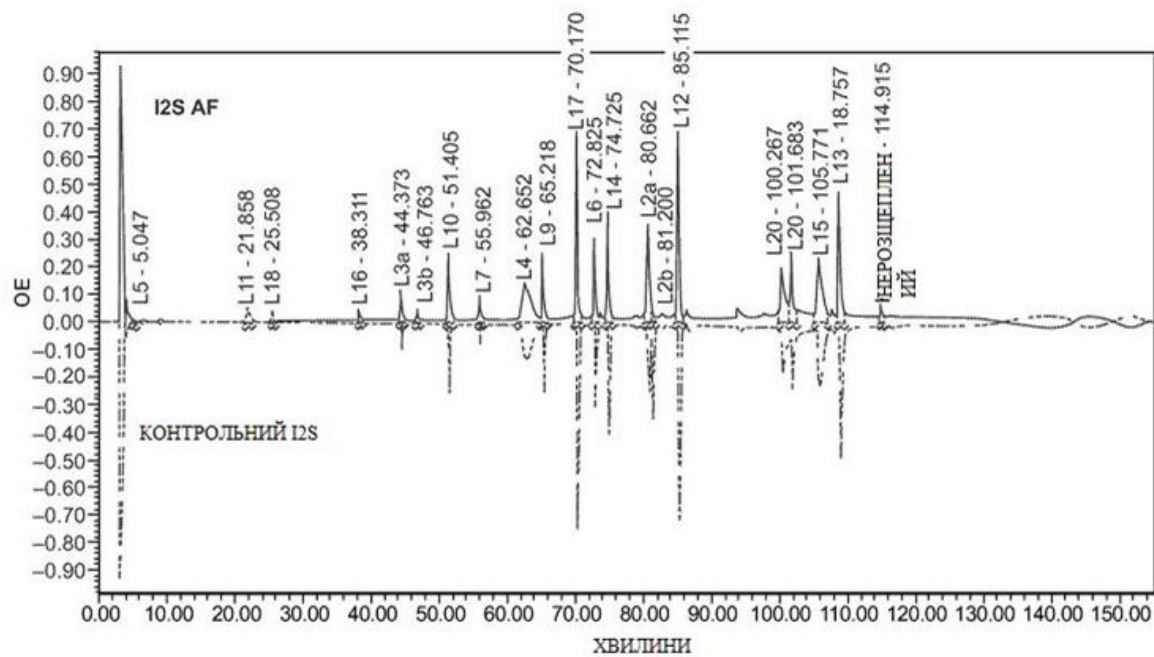
55

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

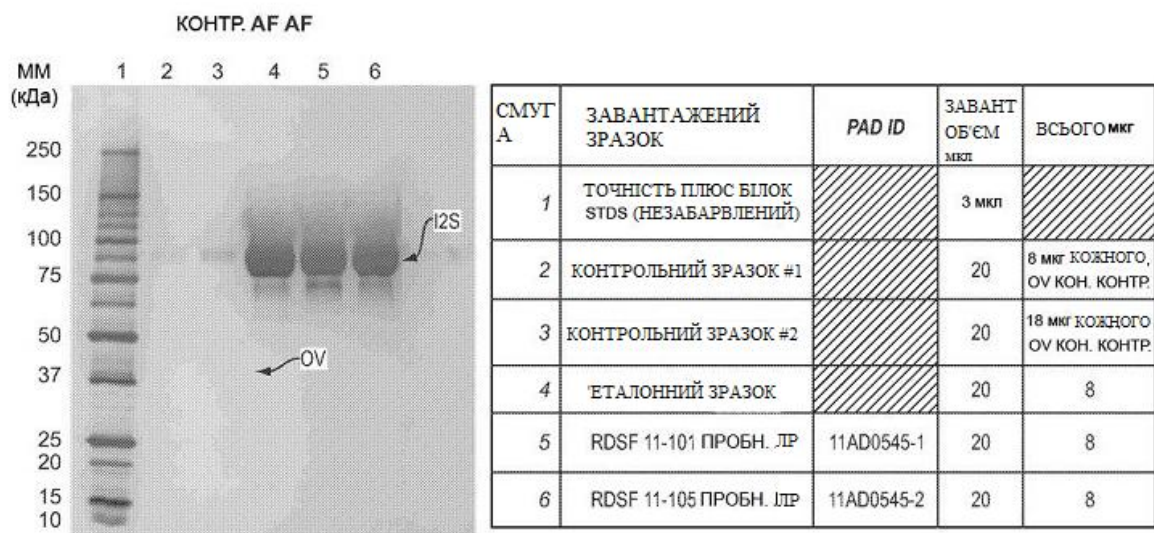
1. Склад, який містить очищену рекомбінантну ідуонат-2-сульфатазу (I2S), що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, при цьому очищена рекомбінантна I2S має щонайменше 70 % перетворення залишків цистеїну, що відповідають Cys59 із SEQ ID NO:1, в C α -формілгліцин (FGly), який **відрізняється** тим, що очищена рекомбінантна I2S містить менше ніж 150 нг/мг білка клітини-хазяїна (БКХ).
2. Склад за п. 1, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S:
 - i) містить щонайменше 10 % біс-фосфорилованих олігосахаридів на молекулу;
 - ii) містить в середньому щонайменше 16 сіалових кислот на молекулу;
 - iii) містить карту гліканів, що характеризується сімома або менше піками, вибраними із груп піків, що відповідають нейтральному (група піків 1), моносіалованому (група піків 2), дисіалованому (група піків 3), монофосфорилованому (група піків 4), трисіалованому (група піків 5), тетрасіалованому (група піків 6) або дифосфорилованому (група піків 7) білку I2S;
 - iv) має специфічну активність, яка становить щонайменше 40 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням як субстрату гепарину дисахариду; або
 - v) має специфічну активність, яка становить щонайменше 20 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу перетворення 4-MUF-SO₄ у 4-MUF.
3. Склад за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S містить менше ніж 100 нг/мг БКХ.
4. Склад за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S містить менше ніж 80 нг/мг БКХ.
5. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищена рекомбінантна I2S містить щонайменше 50 % біс-фосфорилованих олігосахаридів на молекулу.
6. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 50 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням як субстрату гепарину дисахариду.
7. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 60 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу активності виділення сульфату із застосуванням як субстрату гепарину дисахариду.
8. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 30 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу перетворення 4-MUF-SO₄ у 4-MUF.
9. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 40 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу перетворення 4-MUF-SO₄ у 4-MUF.
10. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 50 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу перетворення 4-MUF-SO₄ у 4-MUF.
11. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищений рекомбінантний білок I2S має специфічну активність, яка становить щонайменше 60 Од/мг, визначену за допомогою *in vitro* аналізу перетворення 4-MUF-SO₄ у 4-MUF.
12. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищена рекомбінантна I2S містить щонайменше 75 % перетворення залишків цистеїну, що відповідають Cys59 із SEQ ID NO:1, у C α -формілгліцин (FGly).
13. Склад за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що очищена рекомбінантна I2S містить щонайменше 85 % перетворення залишків цистеїну, що відповідають Cys59 із SEQ ID NO:1, у C α -формілгліцин (FGly).
14. Склад за будь-яким із пунктів 1-13 для застосування в лікуванні синдрому Хантера.



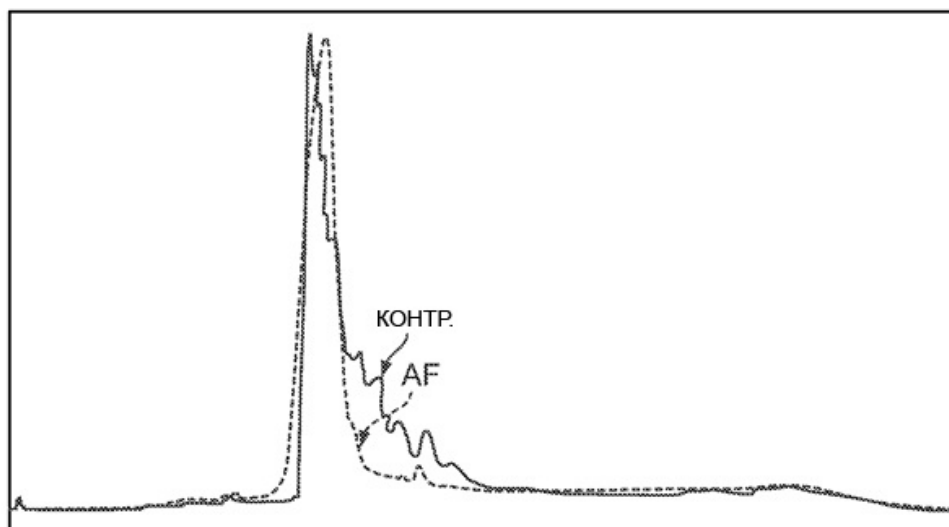
ФІГ.1



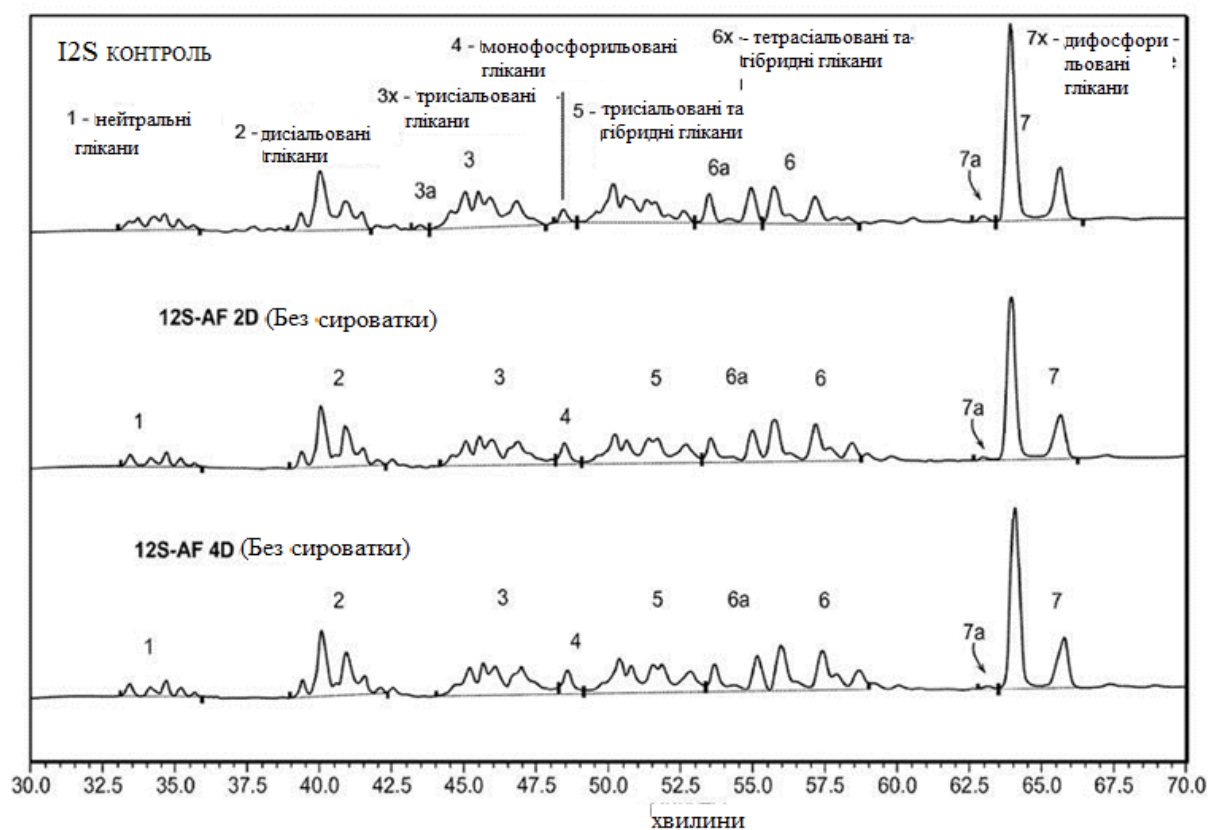
ΦΠ. 2



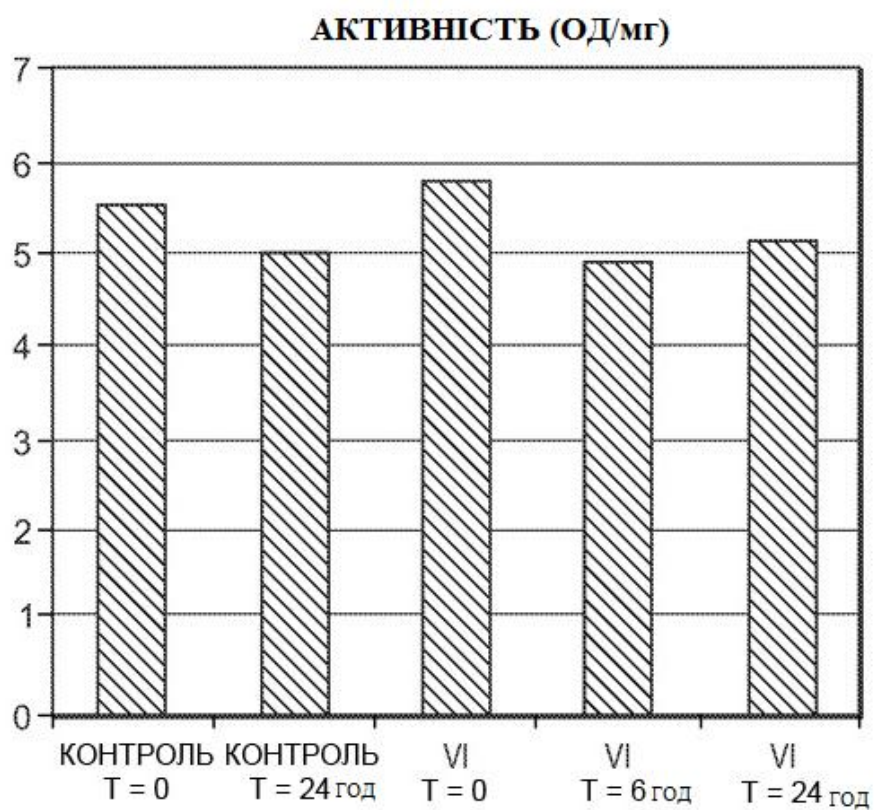
ΦΠ.3



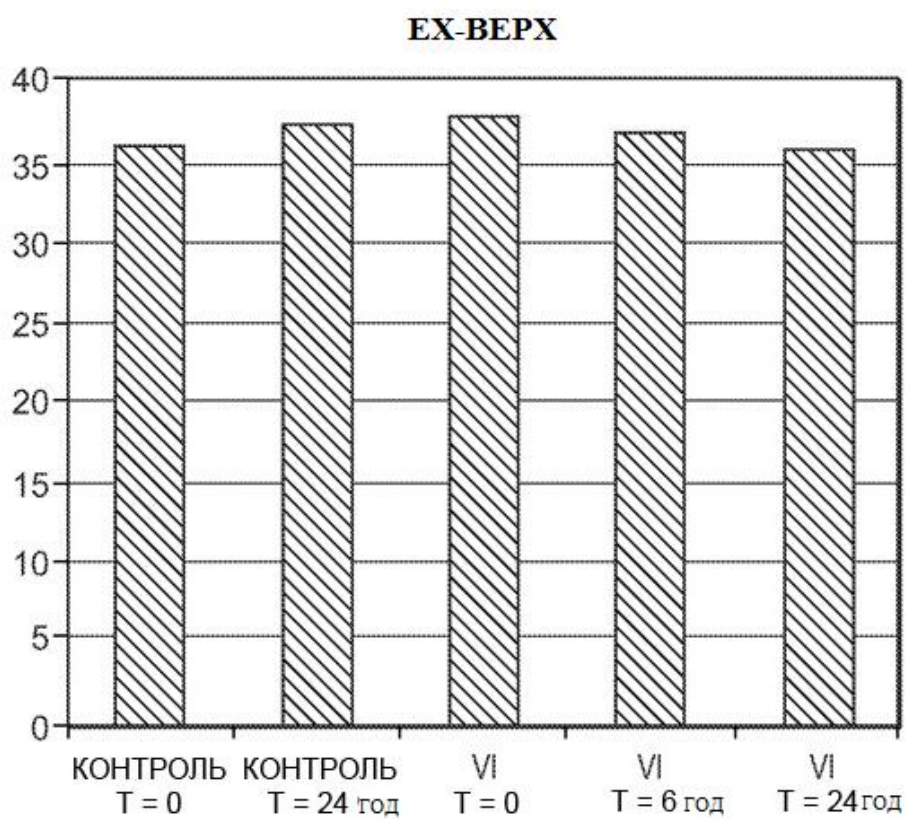
ФІГ. 4



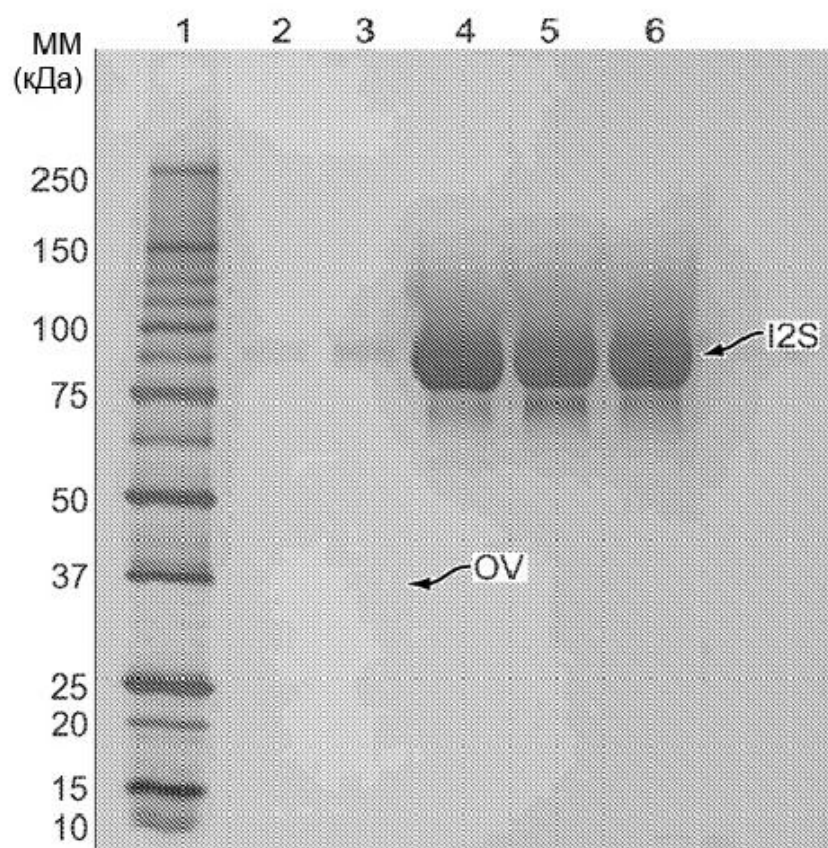
ФІГ. 5



ФІГ.6

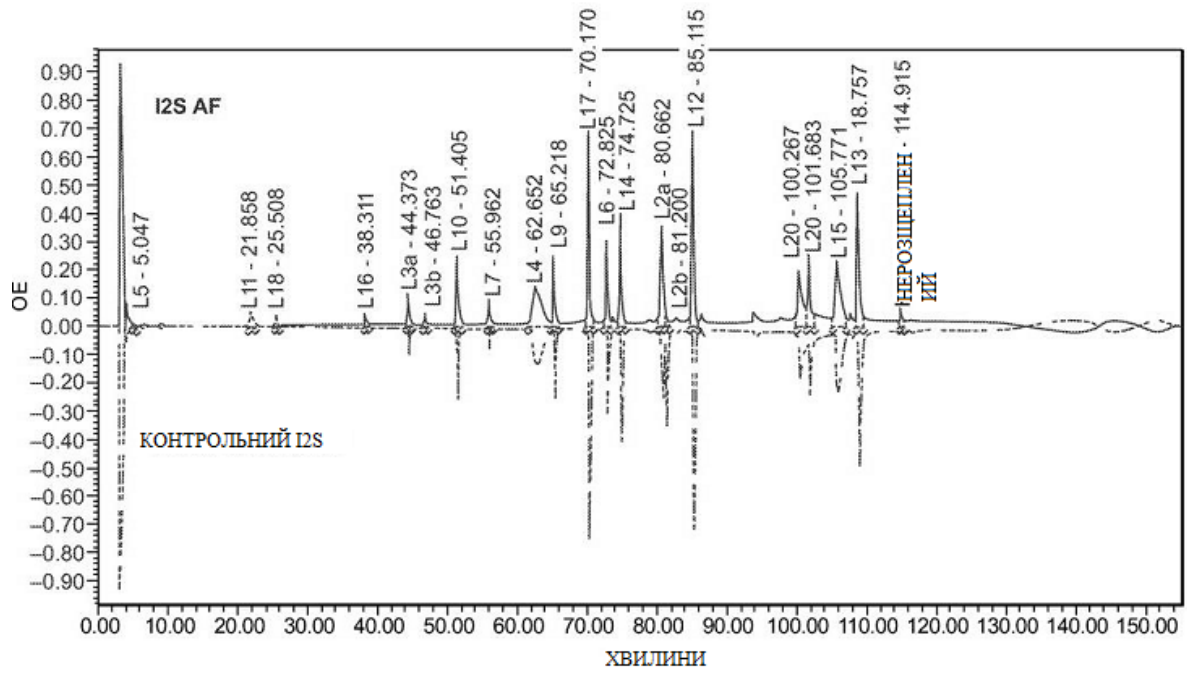


ФІГ.7

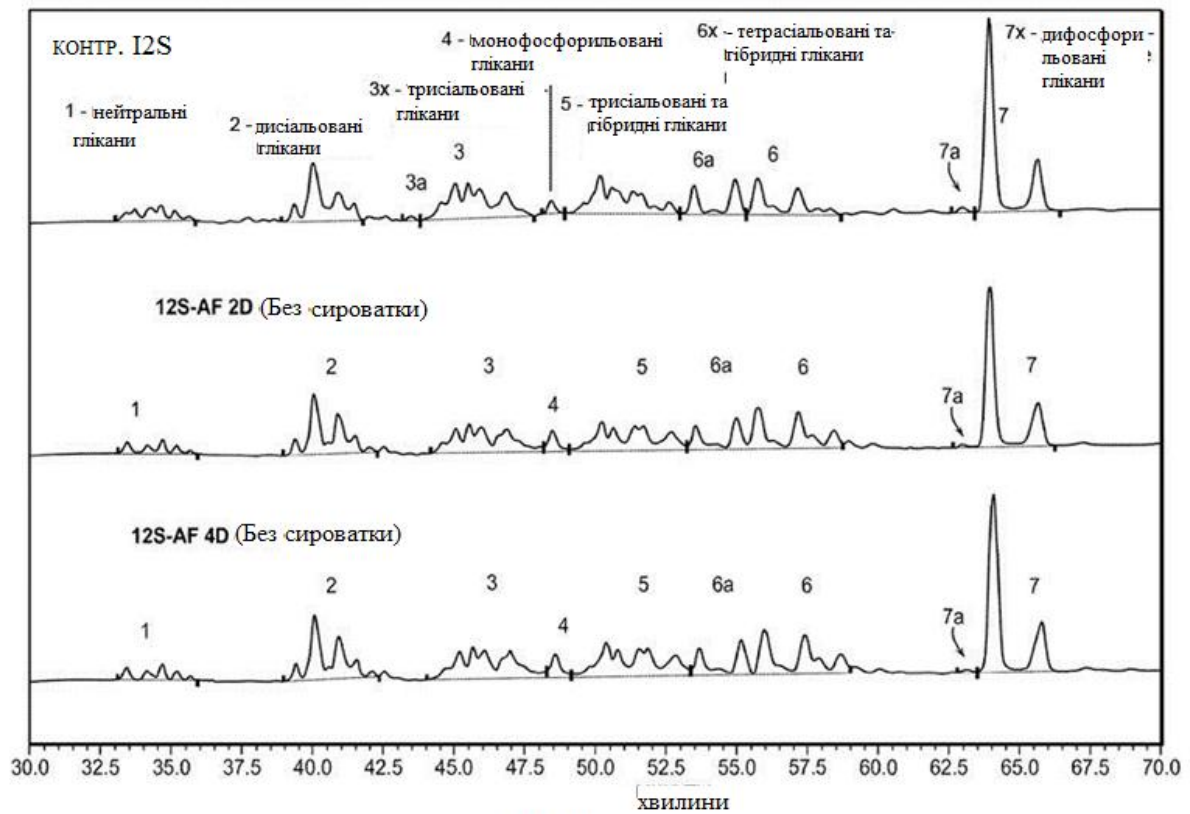


СМУТА	ЗАВАНТАЖЕНИЙ ЗРАЗОК	ЗАВАНТ. ОБ'ЄМ	ВСЬОГО МКГ
1	БЛОК STDS	3 мкл	
2	КОНТРОЛЬНИЙ ЗРАЗОК #18	20 мкл	МКГ
3	КОНТРОЛЬНИЙ ЗРАЗОК #2	20 мкл	16 МКГ
4	ЕТАЛОННИЙ ЗРАЗОК I2S	20 мкл	8 МКГ
5	БЕЗСИРОВАТКОВА КУЛЬТУРА I2S-AF 2D	20 мкл	8 МКГ
6	БЕЗСИРОВАТКОВА КУЛЬТУРА I2S-AF 4D	20 мкл	8 МКГ

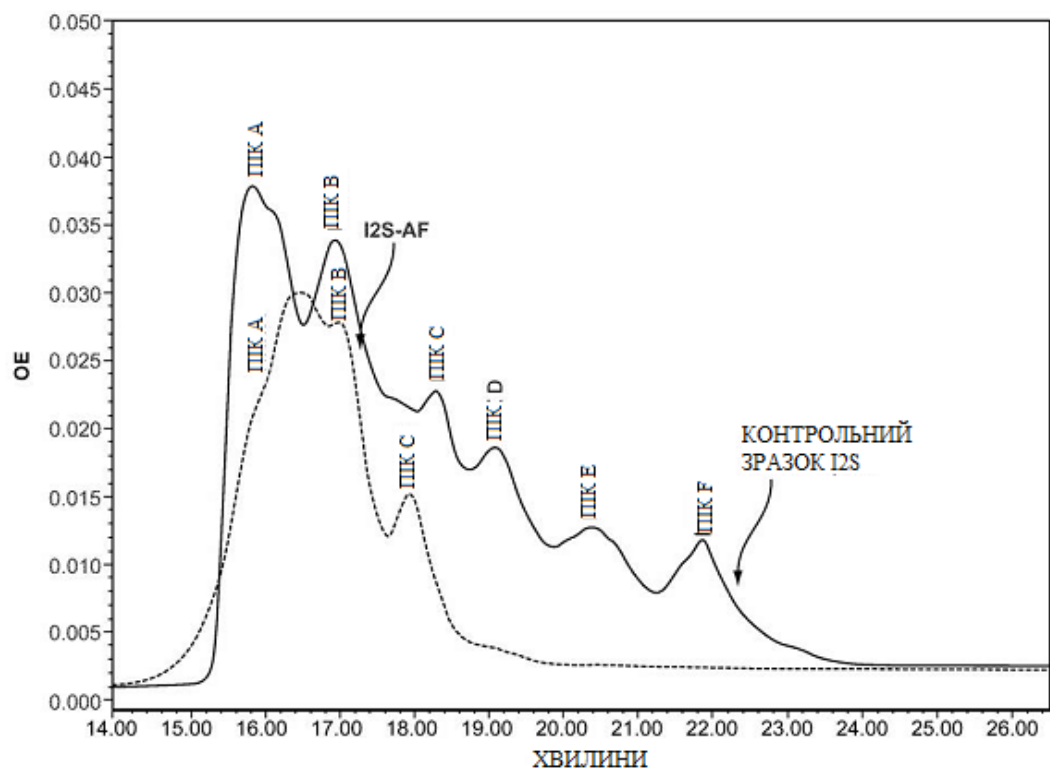
ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10



ФІГ.11

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601