



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118955** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/00
C12P 21/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 13829	(72) Винахідник(и): Болдог Ференс (US), Хартлейн Міхаель (US)
(22) Дата подання заявки: 28.06.2013	(73) Власник(и): ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК ТЕРАПІС, ІНК., 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.04.2019	(74) Представник: Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/666,719	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2004/072275 A2, 26.08.2004 WO 2011/044542 A1, 14.04.2011 WO 2005/113765 A2, 01.12.2005 COSMA M P ET AL, The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases, CELL, CELL PRESS, US, PAGE(S) 445 - 456
(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: 10.04.2015, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2019, Бюл.№ 7	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/048571, 28.06.2013	

(54) КЛІТИНА ТА СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА ІДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗИ

(57) Реферат:

Винахід стосується клітини, що містить першу нуклеїнову кислоту, яка кодує білок ідуронат-2-сульфатази (I2S), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну SEQ ID NO: 1; та другу нуклеїнову кислоту, яка кодує білок формілгліцинутворюючого ферменту (FGE), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну SEQ ID NO: 5, при цьому перша та/або друга нуклеїнова кислота є екзогенною, а клітина за культивування в умовах клітинного культивування виробляє білок I2S, що містить щонайменше близько 70 % залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO: 1, перетворених у C α -формілгліцин (FGly), причому рівень білка ідуронат-2-сульфатази, який експресує клітина, в 0,3-10 разів вище рівня білка формілгліцинутворюючого ферменту, який експресує ця клітина.

UA 118955 C2

Перехресне посилання на споріднені заявки

Ця заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США 61/666719, поданою на реєстрацію 29 червня 2012 р., яка в повному обсязі включена в цей документ в якості посилання.

5 Перелік послідовностей

Цей винахід посилається на Перелік послідовностей, поданий в електронній формі у вигляді файлу ASCII.txt під назвою "2006685-00340_SEQ_LIST" 27 червня 2013 р. Файл.txt був створений 25 червня 2013 р., його розмір становить 25 КБ. Повний зміст Переліку послідовностей включений в цей документ за допомогою посилання.

10 Рівень техніки

Мукополісахаридоз II типу (МПС II, синдром Хантера) – це зчеплене з Х-хромосоною рецесивне захворювання з групи лизосомних 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.

Зазвичай фізичні прояви синдрому Хантера у людей включають як соматичні, так і нейрональні симптоми. Наприклад, у деяких випадках синдрому Хантера ураження центральної

20 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 видатний лоб, 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, зрештою, призвести до загальної катастрофічної недостатності органів. Як наслідок, синдром Хантера завжди є важким, прогресуючим та обмежуючим час життя захворюванням.

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 У винаході, серед іншого, запропоновані вдосконалені способи та композиції для отримання рекомбінантного білка I2S, який робить можливою більш ефективну ферментозамісну терапію за синдрому Хантера. Цей винахід включає відкриття, що більш ефективний рекомбінантний білок I2S можна отримати за допомогою клітин ссавців, сконструйованих так, щоб вони коекспресували рекомбінантний білок I2S та формілгліцин-утворюючий фермент (FGE).

40 Несподівано рекомбінантний білок I2S, отриманий за допомогою таких сконструйованих клітин, характеризується незвично високим рівнем відсотка конверсії у α -формілгліцин (FGly) (наприклад, більш ніж 70 % та аж до 100 %), що призводить до значного поліпшення ферментативної активності рекомбінантного білка I2S. Додатково, клітини ссавців, які коекспресують білки I2S та FGE відповідно до цього винаходу, були успішно адаптовані для

45 вирощування в суспензійній культурі у великих масштабах. Отже, цей винахід забезпечує можливість більш ефективного отримання високоактивного рекомбінантного білку I2S у великих масштабах.

Таким чином, в одному аспекті у цьому винаході запропонована клітина, що містить першу нуклеїнову кислоту, кодуючу білок ідуронат-2-сульфатази (I2S), що має амінокислотну

50 послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) ідентичну SEQ ID NO:1; та другу нуклеїнову кислоту, кодуючу білок формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) ідентичну SEQ ID NO:5, при чому перша та/або друга нуклеїнова кислота є екзогенними, а клітина за культивування в умовах клітинного культивування (наприклад, в суспензійній або адгезивній культурі) виробляє білок I2S, що містить щонайменше близько 70 % (наприклад, щонайменше близько 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %) залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO:1, перетворених у α -формілгліцин (FGly).

60

В іншому аспекті у цьому винаході запропонована клітина, що містить першу нуклеїнову кислоту, кодуєчку білок ідуронат-2-сульфатази (I2S), що має амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) ідентичну SEQ ID NO:1; та другу нуклеїнову кислоту, кодуєчку білок формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) ідентичну SEQ ID NO:5, при чому перша та/або друга нуклеїнова кислота є екзогенними, а клітина за культивування в умовах клітинного культивування виробляє білок I2S, що містить щонайменше близько 50 % (наприклад, щонайменше близько 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %) залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO:1, перетворених у C α -формілгліцин (FGly), за рівня питомої продуктивності більшого, ніж близько 10 пікограмів/клітину/день (наприклад, більшого, ніж близько 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 пікограмів/клітину/день).

У деяких варіантах реалізації винаходу перша нуклеїнова кислота кодує білок I2S, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну SEQ ID NO:1. У деяких варіантах реалізації винаходу друга нуклеїнова кислота кодує білок FGE, що містить амінокислотну послідовність, ідентичну SEQ ID NO:5.

У деяких варіантах реалізації винаходу перша та/або друга нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з промотором hCMV.

У деяких варіантах реалізації винаходу перша та/або друга нуклеїнова кислота є кодон-оптимізованими. У деяких варіантах реалізації винаходу перша нуклеїнова кислота містить послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) ідентичну SEQ ID NO:7. У конкретних варіантах реалізації винаходу перша нуклеїнова кислота містить послідовність SEQ ID NO:7.

У деяких варіантах реалізації винаходу друга нуклеїнова кислота містить послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) ідентичну SEQ ID NO:8. У деяких варіантах реалізації винаходу друга нуклеїнова кислота містить послідовність, ідентичну SEQ ID NO:8.

У деяких варіантах реалізації винаходу і перша і друга нуклеїнові кислоти є екзогенними (також званими рекомбінантними). У деяких варіантах реалізації винаходу перша та/або друга нуклеїнові кислоти інтегровані (наприклад, стабільно) в геном клітини. У деяких варіантах реалізації винаходу перша та/або друга нуклеїнові кислоти присутні в одній або більше позакромосомних конструкціях.

У деяких варіантах реалізації винаходу клітина згідно цього винаходу є клітиною ссавця. У певних варіантах реалізації винаходу придатна клітина ссавця є клітиною людини. У конкретних варіантах реалізації винаходу придатна клітка ссавця є клітиною CHO.

У деяких варіантах реалізації винаходу клітина згідно з винаходом є такою, що адаптується до суспензійної культури. В інших варіантах реалізації винаходу клітина згідно з винаходом є адгезивною.

У додатковому аспекті в цьому винаході запропонований спосіб отримання рекомбінантного білку ідуронат-2-сульфатази (I2S) шляхом культивування клітини, описаної в різних наведених в цьому документі варіантах реалізації винаходу, в таких умовах, що рекомбінантні білки I2S та FGE коекспресуються в клітині. У деяких варіантах реалізації винаходу клітку культивують у великих масштабах. У деяких варіантах реалізації винаходу великі масштаби, придатні для цього винаходу, відповідають процесу, який проходить у біореакторі. У деяких варіантах реалізації винаходу біореактор, придатний для цього винаходу, має об'єм, вибраний з 10 Л, 200 Л, 500 Л, 1000 Л, 1500 Л, 2000 Л. У деяких варіантах реалізації винаходу процес, який відповідає великим масштабам (наприклад, в біореакторі), придатний для цього винаходу, включає процес перфузії. У деяких варіантах реалізації винаходу процес, який відповідає великим масштабам (наприклад, в біореакторі), придатний для цього винаходу, включає використання періодичної культури. У деяких варіантах реалізації винаходу процес, який відповідає великим масштабам, придатний для цього винаходу, являє собою процес, який проходить у ролерному флаконі. У деяких варіантах реалізації винаходу клітину згідно з цим винаходом культивують в суспензії. В інших варіантах реалізації винаходу клітину згідно з цим винаходом культивують адгезивно.

У деяких варіантах реалізації винаходу клітину згідно з цим винаходом культивують в безсироватковому середовищі (наприклад, в середовищі нетваринного походження, хімічно

визначеному або безбілковому середовищі). В інших варіантах реалізації винаходу клітину згідно з цим винаходом культивують в середовищі, що містить сироватку.

У різних варіантах реалізації винаходу спосіб згідно з винаходом додатково включає етап очищення рекомбінантного білку I2S.

5 В іншому аспекті в цьому винаході запропонований рекомбінантний білок ідуронат-2-сульфатази (I2S), отриманий за допомогою клітини або способу, описаних у наведених в цьому документі різних варіантах реалізації винаходу.

10 У деяких варіантах реалізації в цьому винаході запропонований спосіб отримання рекомбінантного білку ідуронат-2-сульфатази (I2S), в якому зазначений рекомбінантний білок I2S має амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 50 % (наприклад, щонайменше приблизно на 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) ідентичну SEQ ID NO:1; та що містить щонайменше близько 70 % (наприклад, щонайменше близько 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO:1, перетворених у Cα-формілгліцин (FGly). У 15 деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S має амінокислотну послідовність, ідентичну SEQ ID NO:1. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S характеризується специфічною активністю, що становить щонайменше близько 20 Е/мг, 30 Е/мг, 40 Е/мг, 50 Е/мг, 60 Е/мг, 70 Е/мг, 80 Е/мг, 90 Е/мг або 100 Е/мг, яка визначається за допомогою in vitro аналізу активності виділення сульфату із застосуванням в якості субстрату 20 гепарин дисахариду.

Серед іншого, в цьому винаході також запропонований фармацевтична композиція, що містить рекомбінантний білок I2S, описаний в наведених в цьому документі різних варіантах реалізації винаходу, та фармацевтично прийнятний носій, а також спосіб лікування синдрому Хантера шляхом введення суб'єктові, який цього потребує, описаного в цьому документі 25 рекомбінантного білка I2S, або фармацевтичної композиції, яка його містить.

Терміни "білок I2S", "I2S", "фермент I2S", які використовуються в цьому документі, або їхні граматичні еквіваленти відносяться до отримання молекул рекомбінантного білку I2S, якщо не вказане інше.

30 Терміни "близько" та "приблизно", які використовуються в цій заявці, застосовуються як еквівалентні. Мається на увазі, що будь-які чисельні значення, наведені в цій заявці з або без близько/приблизно, включають будь-які нормальні відхилення, очевидні для фахівця у відповідній галузі техніки.

Інші ознаки, об'єкти та переваги цього винаходу стануть зрозумілими з нижченаведеного 35 детального опису винаходу. При цьому варто розуміти, що детальний опис, хоча і вказує варіанти реалізації цього винаходу, наведений виключно з ілюстративною, але не обмежувальною метою. Для фахівців у цій галузі техніки різні зміни та модифікації, які входять в об'єм винаходу, стануть зрозумілими з детального опису.

Короткий опис графічних матеріалів

40 Описані нижче Фігури, які є Графічними матеріалами, наведені виключно з ілюстративною, але не обмежувальною метою.

На Фігурі 1 проілюстрована амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:1), кодуюча зрілу форму людського білку ідуронат-2-сульфатази (I2S), а в межах білкової послідовності вказані потенційні ділянки N-зв'язаного глікозилювання та конверсії цистеїну.

45 На Фігурі 2 проілюстровані типові конструкції для коекспресії I2S та FGE (тобто, SUMF1). (A) Експресійні одиниці на окремих векторах (для котрансфекції або послідовних трансфекцій); (B) Експресійні одиниці на одному векторі (одна трансфекція): (1) окремі цистрони та (2) транскрипційно зв'язані цистрони.

На Фігурі 3 проілюстровані типові рівні специфічної активності I2S, які спостерігаються, скорельовані відносно відсотка конверсії у формілгліцин.

50 На Фігурі 4 проілюстрований типовий профіль гліканів, відповідний рекомбінантному ферменту I2S, отриманому за використання клітинних ліній I2S-AF 2D та 4D, які вирощуються в умовах безсироваткового клітинного культивування, порівняно з контрольним рекомбінантним ферментом I2S.

Визначення

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

60 Амінокислота. Термін "амінокислота", який використовується в цьому документі, в найширшому своєму сенсі позначає будь-яке з'єднання та/або речовину, яка може бути включеною в поліпептидний ланцюг. У деяких варіантах реалізації винаходу амінокислота має

наступну загальну структуру: $H_2N-C(H)(R)-COOH$. У деяких варіантах реалізації винаходу амінокислота є амінокислотою природного походження. У деяких варіантах реалізації винаходу амінокислота є синтетичною амінокислотою; у деяких варіантах реалізації винаходу амінокислота є D-амінокислотою; у деяких варіантах реалізації винаходу амінокислота є L-амінокислотою. "Стандартна амінокислота" відноситься до будь-якої з двадцяти стандартних L-амінокислот, які зазвичай входять до складу пептидів природного походження. "Нестандартна амінокислота" відноситься до будь-якої амінокислоти, відмінної від стандартних амінокислот, незалежно від того, отримана вона синтетично або з природного джерела. Термін "синтетична амінокислота", який використовується в цьому документі, включає хімічно модифіковані амінокислоти, включаючи, але не обмежуючись цим, солі, похідні амінокислот (такі як амід) та/або заміщення. Амінокислоти, включаючи карбокси- та/або аміно-термінальні амінокислоти в пептидах, можна модифікувати за допомогою метилування, амідуювання, ацетилювання, захисних груп та/або заміщень іншими хімічними групами, які можуть змінити час напівжиття циркуляції пептидів без істотного впливу на їх активність. Амінокислоти можуть брати участь в утворенні дисульфідного зв'язку. Амінокислоти можуть містити одну або більше посттрансляційних модифікацій, таких як асоціація з одним або більше хімічних компонентів (наприклад, метильними групами, ацетатними групами, ацетиловими групами, фосфатними групами, формільними компонентами, ізопреноїдними групами, сульфатними групами, поліетиленглікольними компонентами, ліпідними компонентами, вуглеводними компонентами, біотиновими компонентами і так далі). У деяких варіантах реалізації винаходу амінокислоти згідно з цим винаходом можна включати або застосовувати як добавку в середовищі для клітинних культур. У деяких варіантах реалізації винаходу амінокислоти, включені або такі, що застосовуються як добавка у клітинному культуральному середовищі, можуть бути представлені у вигляді солей або у гідратній формі.

Приблизно. Термін "приблизно" або "близько", який використовується в цьому документі, застосовується відносно однієї або більше величин, що представляють інтерес, позначає величину, яка є схожою із зазначеною заданою величиною. У певних варіантах реалізації винаходу термін "приблизно" або "близько" відноситься 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 обидві сторони (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).

Періодична культура. Термін "періодична культура", який використовується в цьому документі, відноситься до способу культивування клітин, в якому всі компоненти, які зрештою будуть застосовані в культивуванні клітин, включаючи середовище (дивіться визначення "середовища" нижче), а також самі клітини, додають на початку процесу культивування. Періодичну культуру зазвичай зупиняють в певній точці, а клітини та компоненти із середовища збирають та в деяких випадках очищають.

Біодоступність. Термін "біодоступність", який використовується в цьому документі, в загальному випадку відноситься до тієї відсоткової долі введеної дози, яка досягає кровотоку суб'єкту.

Біологічно активний. Фраза "біологічно активний", яка використовується в цьому документі, відноситься до характеристики будь-якої речовини, яка має активність в біологічній системі (наприклад, клітинній культурі, організмі і так далі). Наприклад, речовина, яка за введення 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, фолдінг, 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.

Біореактор. Термін "біореактор", який використовується в цьому документі, відноситься до

ємності, яка застосовується для вирощування господарської клітинної культури. Біореактор може мати будь-який розмір, придатний для культивування клітин ссавців. Як правило, об'єм біореактора становить щонайменше 1 літр і може становити 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 120000 літрів або більше, або будь-яке з проміжних значень. Умови всередині біореактору, включаючи, але не обмежуючись цим, рівень pH, осмолярність, насичення CO₂, насичення O₂, температуру та комбінації зазначених параметрів, зазвичай регулюють під час періоду культивування. Біореактор може бути виконаний з будь-якого матеріалу, придатного для вмісту клітин в середовищі в умовах культивування згідно з цим винаходом, включаючи скло, пластик або метал. У деяких варіантах реалізації винаходу біореактор можна застосовувати для вирощування культури клітин тварин. У деяких варіантах реалізації винаходу біореактор можна застосовувати для клітин та/або клітинних ліній, отриманих з таких організмів, як, без обмежень, клітини ссавців, клітини комах, бактерійні клітини, дріжджові клітини та клітини людини. У деяких варіантах реалізації винаходу біореактор використовують для отримання клітинних культур у великих масштабах, а його об'єм становить щонайменше 100 літрів та може становити 200, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 120000 літрів або більше, або будь-яке з проміжних значень. Фахівець в цій галузі техніки має відповідні знання і зможе обрати біореактори, придатні для практичної реалізації цього винаходу.

Клітинна культура. Цей термін під час використання в цьому документі відноситься до клітинної популяції, яка вирощується в середовищі в умовах, придатних для виживання та зростання клітинної популяції. Для фахівця в цій галузі техніки зрозуміло, що зазначені терміни під час використання в цьому документі можуть відноситися до комбінації, що включають клітинну популяцію та середовище, в якому ця популяція вирощується.

Культивування. Термін "культивування", який використовується в цьому документі, або його граматичні еквіваленти відноситься до процесу вмісту клітин в умовах, що сприяють зростанню та виживанню. Терміни "культивування" та "клітинна культура" або будь-які інші синоніми використовуються в цій заявці взаємозамінно.

Ємність для культивування. Термін "ємність для культивування", який використовується в цьому документі, відноситься до будь-якого контейнеру, який може забезпечити асептичне середовище для культивування клітин. Типові ємності для культивування включають, але не обмежуються цим, скляні, пластикові або металеві контейнери.

Ферментозамісна терапія (ФЗТ): Термін "ферментозамісна терапія (ФЗТ)", який використовується в цьому документі, відноситься до будь-якої терапевтичної стратегії, яка ліквідує дефіцит ферментів за допомогою введення необхідних ферментів. У деяких варіантах реалізації винаходу необхідний фермент вводять шляхом інтратекального введення. У деяких варіантах реалізації винаходу необхідний фермент вводять шляхом інфузії у кровотік. Після введення фермент захоплюється клітинами та транспортується у лізосоми, 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.

Експресія. Під час використання в цьому документі "експресією" нуклеотидної послідовності називають один або більше з наступних процесів: (1) отримання РНК-матриці за послідовністю ДНК (наприклад, шляхом транскрипції); (2) процесинг РНК-транскрипту (наприклад, шляхом сплайсингу, редагування, утворення 5' кепу та/або утворення 3' кінцю); (3) трансляцію РНК у поліпептид або білок; та/або (4) посттрансляційну модифікацію поліпептиду або білку.

Культура з підживленням. Термін "культура з підживленням", який використовується в цьому документі, відноситься до способу культивування клітин, в якому через якийсь час після початку процесу культивування в культуру додають додаткові компоненти. Компоненти, що додаються, зазвичай містять живильні добавки для клітин, які виснажилися під час процесу культивування. Культуру з підживленням зазвичай зупиняють у певній точці, а клітини та/або компоненти з середовища збирають та в деяких випадках очищують.

Фрагмент. Термін "фрагмент", який використовується в цьому документі, відноситься до поліпептидів та визначається як будь-яка дискретна частина цього поліпептиду, яка є унікальною або характерною для цього поліпептиду. Також під час використання в цьому документі зазначений термін відноситься до будь-якої дискретної частини цього поліпептиду, яка зберігає щонайменше частину активності повнорозмірного поліпептиду. Бажано, щоб частина активності, яка зберігається, становила щонайменше 10 % активності повнорозмірного поліпептиду. Бажаніше, щоб частина активності, яка зберігається, становила щонайменше 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % активності повнорозмірного поліпептиду. Ще

бажаніше, щоб частина активності, яка зберігається, становила щонайменше 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % активності повнорозмірного поліпептиду. Найбажаніше, щоб частина активності, яка зберігається, становила 100 % активності повнорозмірного поліпептиду. Також під час використання в цьому документі зазначений термін відноситься до будь-якої частини заданого

5 поліпептиду, яка містить щонайменше один встановлений елемент послідовності, що міститься в повнорозмірному поліпептиді. Бажано, щоб елемент послідовності збігався з щонайменше 4-5, бажаніше – зі щонайменше близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 або більше амінокислот повнорозмірного поліпептиду.

Ген. Термін "ген", який використовується в цьому документі, відноситься до будь-якої нуклеотидної послідовності, ДНК або РНК, щонайменше частина якої кодує кінцевий дискретний продукт, як правило, але не обмежуючись цим, поліпептид, який бере участь в якомусь аспекті клітинного процесу. Зазначений термін відноситься не лише до кодуєчої послідовності, яка кодує поліпептид або інший кінцевий дискретний продукт, але також може включати ділянки, попередні та наступні за кодуєчою послідовністю, які модулюють базовий рівень експресії, а також вбудовані послідовності ("інтрони") між окремими кодуєчими сегментами ("екзонами"). У деяких варіантах реалізації винаходу ген може містити регуляторні послідовності (наприклад, промотори, енхансери, послідовності поліаденілювання, послідовності термінації, послідовності Козака, ТАТА-бокси і тому подібне) та модифікаційні послідовності. У деяких варіантах реалізації винаходу ген може містити прив'язки до нуклеїнових кислот, які не кодують білки, але кодують функціональні молекули РНК, такі як тРНК, РНК-індукуючі речовини і тому подібне.

10 20

Генний продукт або продукт експресії. Термін "генний продукт" або "продукт експресії", який використовується в цьому документі, в загальному випадку відноситься до РНК, яка транскрибується з гену (до та/або після процесингу), або поліпептиду (до та/або після модифікації), який кодується РНК, яка транскрибується з гену.

25

Генетичний регуляторний елемент. Термін "генетичний регуляторний елемент", який використовується в цьому документі, відноситься до будь-якого елементу послідовності, який модулює експресію гену, з яким він функціонально зв'язаний. Генетичні регуляторні елементи можуть діяти як підвищуючи, так і знижуючи рівні експресії, і можуть розташовуватися до, в межах або за кодуєчою послідовністю. Генетичні регуляторні елементи можуть діяти на будь-якому етапі генної експресії, регулюючи, наприклад, ініціацію, елонгацію або термінацію транскрипції, сплайсинг мРНК, редагування мРНК, стабільність мРНК, локалізацію мРНК в клітині, ініціацію, елонгацію або термінацію трансляції, або будь-який інший етап генної експресії. Генетичні регуляторні елементи можуть діяти окремо або в комбінації один з одним.

30

Гомологія. Термін "гомологія", який використовується в цьому документі, відноситься до повної схожості між полімерними молекулами, наприклад, між молекулами нуклеїнових кислот (наприклад, молекулами ДНК та/або молекулами РНК), та/або між поліпептидними молекулами. У деяких варіантах реалізації винаходу полімерні молекули вважаються "гомологічними" по відношенню одна до одної, якщо їхні послідовності ідентичні щонайменше на 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 %. У деяких варіантах реалізації винаходу полімерні молекули вважаються "гомологічними" по відношенню одна до одної, якщо їхні послідовності є однаковими щонайменше на 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 %.

35 40

Ідентичність. Термін "ідентичність", який використовується в цьому документі, відноситься до повної схожості між полімерними молекулами, наприклад, між молекулами нуклеїнових кислот (наприклад, молекулами ДНК та/або молекулами РНК), та/або між поліпептидними молекулами. Розрахунок відсоткової ідентичності двох нуклеотидних послідовностей, наприклад, можна проводити шляхом вирівнювання двох послідовностей для оптимального порівняння (наприклад, можна вносити гепи до однієї або обох – першу та другу – нуклеотидні послідовності для оптимального вирівнювання, а неідентичними послідовностями в цілях порівняння можна нехтувати). У певних варіантах реалізації винаходу довжина послідовності, що вирівнюється для порівняння, становить щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % або практично 100 % від довжини контрольної послідовності. Потім проводять порівняння нуклеотидів у відповідних нуклеотидних позиціях. Якщо позицію в першій послідовності займає такий же нуклеотид, що й відповідну позицію в другій послідовності, молекули вважаються ідентичними у вказаній позиції. Відсоток ідентичності між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних позицій у вказаних послідовностях з врахуванням кількості гепів та довжини кожного гепу, який потрібно внести для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Порівняння послідовностей та визначення відсотку ідентичності між двома послідовностями можна здійснити за допомогою математичного

45 50 55 60

алгоритму. Наприклад, відсоток ідентичності між двома нуклеотидними послідовностями можна визначити за допомогою алгоритму Майєрса та Міллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17), який використовується в програмі ALIGN (версія 2.0), із застосуванням таблиці ваги заміни залишків PAM120, штрафу за довжину гепу 12 та штрафу за геп 4. У альтернативному варіанті відсоток ідентичності між двома нуклеотидними послідовностями можна визначити за допомогою програми GAP з пакету програмного забезпечення GCG, використовуючи матрицю NWSgapdna.CMP. Багато інших програм для вирівнювання послідовностей, такі як Clustal, є доступними і можуть бути застосовані для визначення ідентичності послідовностей.

Покращуватися, підвищуватися або знижуватися. Під час використання в цьому документі за допомогою термінів "покращуватися", "підвищуватися" або "знижуватися" або їх 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 особина, уражена тією ж самою формою лизосомної хвороби накопичення, що й особина, яка проходить лікування, приблизно того ж віку, що й особина, яка проходить лікування (для гарантії того, що стадії захворювання у особи, яка проходить лікування, і контрольної(их) особи(ин) можна порівняти).

Інtrateкальне введення. Термін "інtrateкальне введення" або "інtrateкальна ін'єкція", який використовується в цьому документі, відноситься до ін'єкції в спинномозковий канал (інtrateкальний простір, що оточує спинний мозок). Можна використовувати різні методи, включаючи, але не обмежуючись цим, латеральну церебровентрикулярну ін'єкцію через отвір бору або цистернальну або поперекову пункцію і т. п. У деяких варіантах реалізації винаходу "інtrateкальне введення" або "інtrateкальна доставка" згідно з цим винаходом відноситься до ІТ введення або доставки через поперекову область або ділянку, тобто, до поперекового ІТ введення або доставки. Термін "поперекова область" або "поперекова ділянка", який використовується в цьому документі, відноситься до області між третім та четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями та, точніше, до L2-S1 ділянки хребту.

Виділений. Термін "виділений", який використовується в цьому документі, відноситься до речовини та/або сполуки, яка була (1) відокремлена від щонайменше деяких компонентів, з якими вона зв'язана під час вихідного отримання (у природі та/або експериментальній установці), і (2) отримана, виготовлена та/або вироблена людиною. Виділені речовини та/або сполуки можуть бути відокремлені від близько 10 %, близько 20 %, близько 30 %, близько 40 %, близько 50 %, близько 60 %, близько 70 %, близько 80 %, близько 90 %, близько 91 %, близько 92 %, близько 93 %, близько 94 %, близько 95 %, близько 96 %, близько 97 %, близько 98 %, близько 99 % або більше ніж близько 99 % інших компонентів, з якими вони були зв'язані спочатку. У деяких варіантах реалізації винаходу виділені речовини є очищеними приблизно на 80 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 91 %, приблизно 92 %, приблизно 93 %, приблизно 94 %, приблизно 95 %, приблизно 96 %, приблизно 97 %, приблизно 98 %, приблизно 99 % або більше ніж приблизно 99 %. За вживання в цьому документі речовина є "очищеною", якщо вона в значній мірі вільна від інших компонентів. Під час використання в цьому документі розрахунок відсотку очищення виділених речовин та/або сполук не повинен включати допоміжні речовини (наприклад, буфер, розчинник, воду і так далі).

Середовище. За вживання в цьому документі цей термін позначає розчин, що містить живильні речовини, які живлять зростаючі клітини. Як правило, ці розчини містять незамінні і замінні амінокислоти, вітаміни, джерела енергії, ліпіди і слідові елементи, необхідні для мінімального росту та/або виживання клітин. Розчин може також містити компоненти, які підвищують зростання та/або виживання відносно мінімального рівня, включаючи гормони та чинники зростання. У деяких варіантах реалізації винаходу середовище отримують з оптимальними для виживання і проліферації клітин рівнем рН та сольовою концентрацією. У деяких варіантах реалізації винаходу середовище може бути "хімічно визначеним середовищем" – безсироватковим середовищем, яке не містить білків, гідролізату або компонентів з невідомою композицією. У деяких варіантах реалізації винаходу хімічно визначене середовище не містить компонентів тваринного походження, а всі компоненти середовища мають відому хімічну структуру. У деяких варіантах реалізації винаходу середовище може бути "середовищем на сироватковій основі" – середовищем, яке було доповнене компонентами тваринного походження, такими як, без обмежень, фетальна теляча сироватка, кінська сироватка, козлиня сироватка, ослия сироватка та/або їх комбінації.

Нуклеїнова кислота. Термін "нуклеїнова кислота", який використовується в цьому документі, в найширшому своєму сенсі позначає будь-яку сполуку та/або речовину, яка включена або

може бути включена у олігонуклеотидний ланцюг. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнова кислота є сполукою та/або речовиною, яка включена або може бути включена в олігонуклеотидний ланцюг за допомогою фосфодиефірного зв'язку. У деяких варіантах реалізації винаходу "нуклеїнова кислота" відноситься до окремих залишків нуклеїнових кислот (наприклад, нуклеотидам та/або нуклеозидам). У деяких варіантах реалізації винаходу "нуклеїнова кислота" відноситься до олігонуклеотидного ланцюга, що містить окремі залишки нуклеїнових кислот. Терміни "олігонуклеотид" та "полінуклеотид", які використовуються в цьому документі, можна використовувати взаємозамінно. У деяких варіантах реалізації винаходу "нуклеїнова кислота" включає РНК, а також одно- та/або дволанцюжкові ДНК та/або кДНК. Крім того, терміни "нуклеїнова кислота", "ДНК", "РНК" та/або подібні ним терміни включають аналоги нуклеїнових кислот, тобто, аналоги, що містять скелет, відмінний від фосфодиефірного. Наприклад, так звані "пептидні нуклеїнові кислоти", які відомі в цій галузі техніки та містять в скелеті пептидні зв'язки замість фосфодиефірних зв'язків, вважаються такими, що входять в об'єм цього винаходу. Термін "нуклеотидна послідовність, кодуюча амінокислотну послідовність" включає всі нуклеотидні послідовності, які є виродженими версіями одна одної та/або кодують одну й ту ж амінокислотну послідовність. Нуклеотидні послідовності, кодуючі білки та/або РНК, можуть містити інтрони. Нуклеїнові кислоти можуть бути отримані з природних джерел та очищені, отримані за допомогою рекомбінантних експресійних систем та необов'язково очищені, хімічно синтезовані і так далі. Коли це доцільно, наприклад, у випадку хімічно синтезованих молекул, нуклеїнові кислоти можуть містити нуклеозидні аналоги, такі як аналоги, що містять хімічно модифіковані основи або цукри, модифікації скелету і так далі. Послідовність нуклеїнових кислот представляють в напрямі від 5' до 3', якщо не вказане інше. Термін "сегмент нуклеїнової кислоти" використовується в цьому документі для позначення нуклеотидної послідовності, яка є частиною більш довгої нуклеотидної послідовності. У багатьох варіантах реалізації винаходу сегмент нуклеїнової кислоти містить щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше залишків. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнова кислота є або містить природні нуклеозиди (наприклад, аденозин, тимідин, гуанозин, цитидин, уридин, дезоксиаденозин, дезокситимідин, дезоксигуанозин та дезоксицитидин); нуклеозидні аналоги (наприклад, 2-аміноаденозин, 2-тиотимідин, інозин, пирролопіримідин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, С-5 пропінілцитидин, С-5 пропінілуридин, 2-аміноаденозин, С5-бромουридин, С5-фторуридин, С5-йодоуридин, С5-пропінілуридин, С5-пропінілцитидин, С5-метилцитидин, 2-аміноаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, О(6)-метилгуанін та 2-тиоцитидин); хімічно модифіковані основи; біологічно модифіковані основи (наприклад, метильовані основи); інтеркальовані основи; модифіковані цукри (наприклад, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабінозу та гексозу); та/або модифіковані фосфатні групи (наприклад, тифосфати та 5'-N-фосфорамідитні сполуки). У деяких варіантах реалізації цей винахід безпосередньо відноситься до "немодифікованих нуклеїнових кислот", під якими маються на увазі ті нуклеїнові кислоти (наприклад, полінуклеотидів та залишків, включаючи нуклеотиди та/або нуклеозиди), які не були хімічно модифіковані з метою полегшення або здійснення доставки.

Процес перфузії. Термін "процес перфузії", який використовується в цьому документі, відноситься до способу культивування клітин, в якому додаткові компоненти додають в культуру безперервно або напівбезперервно після початку процесу культивування. Компоненти, що додаються, зазвичай містять живильні добавки для клітин, які виснажилися під час процесу культивування. Частина клітин та/або компонентів середовища зазвичай збирають в безперервному або напівбезперервному режимі і в деяких випадках очищають. Зазвичай процес клітинного культивування, який включає процес перфузії, називають "перфузійною культурою". Як правило, живильні добавки додають в свіже середовище під час процесу перфузії. У деяких варіантах реалізації винаходу свіже середовище може бути ідентичним або схожим з основним середовищем, яке застосовується в процесі клітинного культивування. У деяких варіантах реалізації винаходу свіже середовище може відрізнятися від основного середовища, але при цьому містити необхідні живильні добавки. У деяких варіантах реалізації винаходу свіже середовище є хімічно визначеним середовищем.

Білок. Термін "білок", який використовується в цьому документі, відноситься до поліпептиду (тобто, ланцюги із щонайменше двох амінокислот, з'єднаних одна з одною пептидними зв'язками). Білки можуть містити відмінні від амінокислот компоненти (наприклад, вони можуть бути глікопротеїнами, протеогліканами і так далі) та/або можуть бути процесованими або модифікованими будь-яким іншим способом. Фахівцям в цій галузі техніки зрозуміло, що "білок" може бути повним поліпептидним ланцюгом, який виробляється клітиною (з наявністю або відсутністю сигнальної послідовності), або може бути її характеристичною частиною. У деяких

варіантах реалізації винаходу білок інколи може містити більше за один поліпептидний ланцюг, наприклад, ланцюги, зв'язані одним або більше дисульфідних зв'язків або з'єднані іншими способами. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептиди можуть містити L-амінокислоти, D-амінокислоти або й ті й інші, та можуть містити будь-які з безлічі відомих в цій галузі техніки

5 амінокислотних модифікацій або аналогів. Модифікації, які застосовуються, включають, наприклад, термінальне ацетилювання, амідування, метилування і так далі. У деяких варіантах реалізації винаходу білки можуть містити амінокислоти природного походження, амінокислоти неприродного походження, синтетичні амінокислоти та їх комбінації. У загальному випадку термін "пептид" використовується для позначення поліпептиду, довжина якого становить менше

10 ніж близько 100 амінокислот, менше ніж близько 50 амінокислот, менше ніж близько 20 амінокислот або менше ніж близько 10 амінокислот. У деяких варіантах реалізації винаходу білки є антитілами, фрагментами антитіл, їх біологічно активними частинами та/або їх характеристичними частинами.

Рекомбінантний білок та рекомбінантний поліпептид. Ці терміни використовуються в цьому документі для позначення поліпептиду, який експресується клітиною-господарем, яка була генетично сконструйована для експресії цього поліпептиду. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок може експресуватися в клітині-господарі, отриманій від тварини. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок може експресуватися в клітині-господарі, отриманій від комахи. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок

20 може експресуватися в клітині-господарі, отриманій з дріжджів. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок може експресуватися в клітині-господарі, отриманій з представника прокариотів. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок може експресуватися в клітині-господарі, отриманій від ссавця. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок може експресуватися в клітині-господарі, отриманій від людини.

25 У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, який рекомбінантно експресується, може бути ідентичним або схожим з поліпептидом, який зазвичай експресується в клітині-господарі. У деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, який рекомбінантно експресується, може бути чужорідним клітині-господарю, тобто, гетерологічним пептидам, які зазвичай експресуються в клітині-господарі. В альтернативному варіанті в деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид, який рекомбінантно експресується, може бути химерним, що означає, що частини поліпептиду містять амінокислотні послідовності, які є ідентичними або схожими з поліпептидами, які зазвичай експресуються в клітині-господарі, тоді як інші частини є чужорідними клітині-господарю.

Замісний фермент. Термін "замісний фермент", який використовується в цьому документі, відноситься до будь-якого ферменту, який може діяти таким чином, щоб щонайменше частково замінити дефіцитний або відсутній фермент за захворювання, лікування якого проводиться. У деяких варіантах реалізації винаходу термін "замісний фермент" відноситься до будь-якого ферменту, який може діяти так, щоб щонайменше частково замінити дефіцитний або відсутній лизосомний фермент за лизосомної хвороби накопичення, лікування якої проводиться. У деяких

40 варіантах реалізації винаходу замісний фермент здатний знижувати кількість накопиченого матеріалу в лизосомах ссавців або може знімати або полегшувати один або більше симптомів лизосомної хвороби накопичення. Замісні ферменти, придатні для винаходу, включають лизосомні ферменти як дикого типу, так і модифіковані, і можуть бути отримані за допомогою рекомбінантних та синтетичних способів або очищені з природних джерел. Замісний фермент

45 може бути рекомбінантним, синтетичним, таким, що генно-активується, або природним ферментом.

Вектор. Термін "вектор", який використовується в цьому документі, відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка здатна транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. У деяких варіантах реалізації винаходу вектори здатні до позахромосомної реплікації та/або експресії нуклеїнових кислот, з якими вони зв'язані в клітині-господарі, такий як еукариотична та/або прокариотична клітина. Вектори, здатні управляти експресією функціонально зв'язаних генів, називаються в цьому документі "експресійними векторами".

Детальний опис винаходу

У цьому винаході, серед іншого, запропоновані способи та композиції для отримання рекомбінантного білку I2S з покращеними ефективністю та активністю за допомогою клітин, коекспресуючих білки I2S та FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини згідно з цим винаходом сконструйовані так, щоб одночасно надекспресувати рекомбінантні білки I2S та FGE. Клітини згідно з винаходом адаптуються до багатьох умов клітинного культивування. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини згідно з цим винаходом адаптуються до суспензійного безсироваткового культивування у великих масштабах.

60

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.

Ідуронат-2-сульфатаза (I2S)

- 5 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.
- 10 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
- 15 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 видаленням сигнальним пептидом та повнорозмірний попередник (SEQ ID NO:2) типового білку I2S дикого типу або
- 20 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 ідуронат-2-сульфатаза

Зріла форма	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLPDLPFDSASQLMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHV ELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:1)
Повно-розмірний попередник (ізоформа а)	MPPPRGTGRGLLWGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLPDLPFDSASQLMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHV ELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:2)
Попередник, ізоформа b	MPPPRGTGRGLLWGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQEDQSSTGFRLKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
Попередник, ізоформа c	MPPPRGTGRGLLWGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGFMLMRTNT(SEQ ID NO:4)

Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S є зрілим людським білком I2S (SEQ ID NO:1). Як розкрито в цьому документі, SEQ ID NO:1 являє собою канонічну амінокислотну послідовність людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу білок I2S може являти собою сплайс-ізоформу та/або варіант SEQ ID NO:1, які утворюються в результаті транскрипції на іншій ділянці ініціації в межах 5' UTR гену I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу відповідний замісний фермент 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 замінів, 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 замісний фермент, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі гомологічним зрілому людському білку I2S (SEQ ID NO:1). У деяких варіантах реалізації винаходу замісний фермент, придатний для цілей цього винаходу, 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 замісний фермент, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі ідентичним зрілому людському білку I2S (SEQ ID NO:1). У деяких варіантах реалізації винаходу замісний фермент, придатний для цілей цього винаходу, 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 замісний фермент, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину зрілого людського білку I2S.

В альтернативному варіанті фермент I2S є повнорозмірним білком I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент 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 фермент I2S є в значній мірі гомологічним повнорозмірному людському білку I2S (SEQ ID NO:2). У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, 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:2. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, 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:2. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину повнорозмірного людського білка I2S. У контексті цього документу повнорозмірний білок I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, є ізоформою а людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу придатний фермент 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 фермент I2S є в значній мірі гомологічною ізоформою а людського білку I2S (SEQ ID NO:3). 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 гомологічну SEQ ID NO:3. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S є в значній мірі ідентичним SEQ ID NO:3. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, 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 білка I2S. У контексті цього документу ізоформа а людського білка I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

У деяких варіантах реалізації винаходу фермент I2S є ізоформою b людського білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу придатний фермент 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 замін, 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 фермент I2S є в значній мірі гомологічним ізоформі b людського білку I2S (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 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 фермент I2S, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину ізоформи b людського білку I2S. У контексті цього документу ізоформа b людського білку I2S зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

Гомологи або аналоги людських білків I2S можна отримати відповідно до способів зміни поліпептидної послідовності, відомих фахівцям 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" відноситься до амінокислотної заміни, яка не призводить до зміни відносного заряду або характерних розмірів білка, в якому проводиться амінокислотна заміна.

У деяких варіантах реалізації винаходу ферменти I2S містять компонент, який зв'язується з рецептором на поверхні клітин для того, щоб полегшити клітинне поглинання та/або лизосомне 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. Компонентом, придатним для лизосомного націлювання, може бути IGF-I, IGF-II, RAP, p97, а також їх 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). У деяких варіантах реалізації винаходу відповідний рецептор, з яким зв'язуються залишки M6P, може бути катіон-залежним.

Формілгліцин-утворюючий фермент (FGE)

Як правило, на ферментативну активність I2S впливає посттрансляційна модифікація консервативного цистеїну (наприклад, відповідного амінокислоті 59 зрілого людського I2S (SEQ ID NO:1)) у формілгліцин, який також називають 2-аміно-3-оксопропіоною кислотою або оксоаланіном. Посттрансляційна модифікація зазвичай відбувається в ендоплазматичному ретикулумі під час синтезу білку та каталізує формілгліцин-утворюючим ферментом (FGE). Специфічна ферментативна активність I2S зазвичай позитивно корелює зі ступенем формілгліцинової модифікації I2S. Наприклад, препарат білку I2S, що містить відносно велику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно високою специфічною ферментативною активністю; а препарат білку I2S, що містить відносно невелику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно низькою специфічною ферментативною активністю.

Таким чином, клітини, придатні для отримання рекомбінантного білку I2S згідно цього винаходу, зазвичай експресують також білок FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини експресують ендогенний білок FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини сконструйовані так, щоб експресувати екзогенний (також званий рекомбінантним) формілгліцин-утворюючий фермент (FGE) в комбінації з рекомбінантним I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини сконструйовані так, щоб активувати ендогенний ген FGE для підвищення рівня експресії або активності білка FGE.

Як правило, людський білок FGE виробляється у формі попередника. Форма попередника людського FGE містить сигнальний пептид (амінокислотні залишки 1-33 повнорозмірного попередника) і ланцюг (залишки 34-374 повнорозмірного попередника). Зазвичай форму попередника називають також повнорозмірним попередником або повнорозмірним білком FGE, що містить 374 амінокислоти. Амінокислотні послідовності зрілої форми (SEQ ID NO:5) з

видаленим сигнальним пептидом і повнорозмірний попередник (SEQ ID NO:6) типового білку FGE дикого типу або природного походження наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Людський формілгліцин-утворюючий фермент (FGE)

Зріла форма	SQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSSREANAPGPV PGERQLAHSKMVIPIAGVFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAY EVSNTFEFEKFNSTGYLTEAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAP WWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSNDAYAYCTWAGKRL PTEAEWEYSCRGGHLNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGE DGFQGTAPVDAFPNGYGLYNIVGNAWEWTSWWTVHHSVEETLNPK GPPSGKDRVKKGGSYCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCA ADRLPTMD (SEQ ID NO:5)
Повнорозмірний попередник	MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGS CGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSSREANAPGPVPGERQLAHSKMVIPIAG VFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEFEKFNSTGYL TEAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPWWLPVKGANWRHPEGP DSTILHRPDHPVLHVSNDAYAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGHLNRL LFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGY GLYNIVGNAWEWTSWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMC HRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD (SEQ ID NO:6)

5 Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу ферментом FGE, придатним для цілей цього винаходу, є зрілий людський білок FGE (SEQ ID NO:5). У деяких варіантах реалізації винаходу придатний фермент FGE може бути гомологом або аналогом зрілого людського білка FGE. Наприклад, гомолог або аналог зрілого людського білку FGE може бути модифікованим зрілим людським білком FGE, що містить одну або більше амінокислотних замін, делецій та/або

10 інсерцій в порівнянні з білком FGE дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:5), і при цьому зберігати значну частину активності білку FGE. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі гомологічним зрілому людському білку FGE (SEQ ID NO:5). У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, містить амінокислотну

15 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:5. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі ідентичним зрілому людському білку FGE (SEQ ID NO:5). У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, містить амінокислотну

20 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:5. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину зрілого людського білку FGE.

В альтернативному варіанті ферментом FGE, придатний для цілей цього винаходу, є повнорозмірний людський білок FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE може бути гомологом або аналогом повнорозмірного людського білку FGE. Наприклад, гомолог або аналог повнорозмірного людського білку FGE може бути модифікованим повнорозмірним людським білком FGE, що містить одну або більше амінокислотних замін, делецій та/або

25 інсерцій в порівнянні з повнорозмірним білком FGE дикого типу або природного походження (наприклад, SEQ ID NO:6), і при цьому зберігати значну частину активності білку FGE. Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі гомологічним повнорозмірному людському білку FGE (SEQ ID NO:6). У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, 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

30 ID NO:4. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, є в значній мірі ідентичним SEQ ID NO:6. У деяких варіантах реалізації винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, 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:6. У деяких варіантах реалізації

35

40

винаходу фермент FGE, придатний для цілей цього винаходу, містить фрагмент або частину повнорозмірного людського білка FGE. У контексті цього документу повнорозмірний білок FGE зазвичай містить сигнальну пептидну послідовність.

Типові нуклеотидні послідовності та амінокислотні послідовності, кодуєчі типові білки FGE, розкриті в публікації США № 20040229250, повний зміст якої включений в цей документ в якості посилання.

Клітини, коекспресуючі I2S та FGE

У цьому винаході вказується на необхідність комерційного виробництва біологічно активного I2S на високому рівні за допомогою системи клітинного культивування. Оскільки велика кількість виробничих чинників може впливати на вибір певної клітини-господаря, молекули нуклеїнових кислот, розкриті в цьому винаході, відносяться до широкого спектру прокариотичних та еукаріотичних клітин та клітинних ліній, включаючи, без обмежень, клітинні лінії, отримані зі штамів бактерій, штамів дріжджів, клітин комах, клітин тварин, клітин ссавців та клітин людини. В аспектах цього винаходу також запропоновані експресійні конструкції та генерація рекомбінантних стабільних клітинних ліній, придатних для експресії білків I2S та/або FGE, як природного походження, так і модифікованих, які розкриті в цьому винаході. Додатково, в аспектах цього винаходу також запропоновані способи для отримання клітинних ліній, експресуючих I2S та FGE, за допомогою розкритих в цьому винаході нуклеотидних послідовностей.

Нуклеїнові кислоти, кодуєчі білки I2S та/або FGE

У деяких варіантах реалізації винаходу запропоновані молекули нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, кодуєчі представляючий інтерес рекомбінантний ген (званий в цьому документі трансгеном), такий як білок I2S та/або FGE, описаний в багатьох наведених в цьому документі варіантах реалізації винаходу. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнова кислота, кодуєча трансген, може бути модифікована для того, щоб забезпечити підвищену експресію білку I2S та/або FGE, який кодується, що також називається кодонною оптимізацією. Наприклад, нуклеїнова кислота, кодуєча трансген, може бути модифікована шляхом зміни відкритої рамки зчитування для кодуєчої послідовності. Термін "відкрита рамка зчитування", який використовується в цьому документі, є синонімом "ORF" та позначає будь-яку нуклеотидну послідовність, потенційно здатну кодувати білок або частину білку. Відкрита рамка зчитування зазвичай починається зі стартового кодону (представленого в стандартному коді у вигляді, наприклад, AUG для молекули РНК та ATG в молекулі ДНК), складається з кодонів-триплетів та закінчується стоп-кодоном (представленим в стандартному коді у вигляді, наприклад, UAA, UGA або UAG для молекули РНК та TAA, TGA або TAG в молекулі ДНК). Термін "кодон", який використовується в цьому документі, позначає послідовність з трьох нуклеотидів в молекулі нуклеїнової кислоти, яка визначає конкретну амінокислоту під час синтезу білку; також його називають триплетом або кодон-триплетом. Наприклад, з 64 можливих кодонів в стандартному генетичному коді два кодони – GAA та GAG – кодуєчі амінокислоту глутамін, а кодони AAA і AAG відповідають амінокислоті лізину. У стандартному генетичному коді три кодони є стоп-кодонами, які не відповідають жодній амінокислоті. Термін "синонімічний кодон", який використовується в цьому документі, позначає будь-який та будь-які кодони, кодуєчі одну амінокислоту. За винятком метіоніну і триптофану амінокислоти кодуєчі від двох до шести синонімічних кодонів. Наприклад, в стандартному генетичному коді чотири синонімічними кодонами, кодуєчими амінокислоту аланін, є GCA, GCC, GCG і GCU, двома синонімічними кодонами, які визначають глутамін, є GAA і GAG, а двома синонімічними кодонами, кодуєчими лізин, є AAA і AAG.

У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнову кислоту, кодуєчу відкриту рамку зчитування білку I2S та/або FGE, можна модифікувати за допомогою стандартних способів кодонної оптимізації. Для практичної реалізації цього винаходу доступні та можуть застосовуватися різні комерційні алгоритми кодонної оптимізації. Як правило, кодонна оптимізація не призводить до зміни кодованих амінокислотних послідовностей. У деяких варіантах реалізації винаходу результатом кодонної оптимізації можуть бути такі амінокислотні зміни як заміни, делеції або інсерції. Як правило, такі амінокислотні зміни істотно не впливають на активність білку.

Типові нуклеотидні послідовності, кодуєчі білки I2S та FGE, відповідно, показані нижче як SEQ ID NO:7 та 8.

SEQ ID NO:7 Типова нуклеотидна послідовність, кодуєча ідуронат-2-сульфатазу (I2S)

ATGCCCCCGCCCCGACCGGCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCAGCGTG
TGCGTGGCCCTGGGCGAGAGACCCAGGCCAACAGCACCACCGACGCCCTGAACGTGCTGCTG
ATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGCGACAAGCTGGTGCGCAGCCCC

AACATCGACCAGCTGGCCAGCCACAGCCTGCTGTTCCAGAACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTG
 TGCGCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTGACCGGCCGCCGCCGACACCACCCGCCTGTACGAC
 TTCAACAGCTACTGGCGCGTGCACGCCGGAACCTTCAGCACCATCCCCAGTACTTCAAGGAGA
 ACGGCTACGTGACCATGAGCGTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCG
 5 ACGACAGCCCCTACAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCACCCAGCAGCGAGAAGTACGAGAACA
 CCAAGACCTGCCGCGGCCCGACGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGCCCCGTGGACGTG
 CTGGACGTGCCCGAGGGCACCCCTGCCCGACAAGCAGAGCACCGAGCAGGCCATCCAGCTGCT
 GGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCTTCTTCTGCGCGTGGGCTACCACAAGCCCCACAT
 CCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCCAGAAGCTGTACCCCTGGAGAACATCACCCCTGGCCCCC
 10 GACCCCGAGGTGCCCGACGGCCTGCCCCCGTGGCCTACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAG
 CGCGAGGACGTGCAGGCCCTGAACATCAGCGTGCCTACGGCCCCATCCCCGTGGACTTCCAG
 CGCAAGATCCGCGAGAGCTACTTCGCCAGCGTGAGTACCTGGACACCCAGGTGGGCCGCTG
 CTGAGCGCCTGGACGACCTGCAGCTGGCCCAACGACCATCATCGCCTTACCAGCGACCAC
 GGCTGGGCCCTGGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAACTTCGACGTGGCCACCCA
 15 CGTGCCCTGATCTTCTACGTGCCCGGCCGACCGCCAGCCTGCCCGAGGCCGGCGAGAAGCT
 GTTCCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCCAGCCAGCTGATGGAGCCCGGCCGCGAGCAT
 GGACCTGGTGGAGCTGGTGAGCCTGTTCCCCACCTGGCCGGCCTGGCCGGCCTGCAGGTGC
 CCCCCCGCTGCCCGTGCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGCGAGGGCAAGAACCTGCTGA
 AGCACTTCCGCTTCCGCGACCTGGAGGAGGACCCCTACCTGCCCGGCAACCCCGCGAGCTGA
 20 TCGCCTACAGCCAGTACCCCGCCCCAGCGACATCCCCAGTGGAACAGCGACAAGCCAGCC
 TGAAGGACATCAAGATCATGGGCTACAGCATCCGCACCATCGACTACCGCTACACCGTGTGGGT
 GGGCTTCAACCCCGACGAGTTCTTGGCCAACCTTCAGCGACATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTC
 GTGGACAGCGACCCCTGCAGGACCACAACATGTACAACGACAGCCAGGGCGGCGACCTGTTT
 CAGCTGCTGATGCCCTAG

25 SEQ ID NO:8 Типова нуклеотидна послідовність, кодує повнорозмірний формілгліцин-
 утворюючий фермент-попередник (FGE)

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTCCTCT
 TGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGCG
 GGCGCGGGGTCCCTTGC GG GTTCTTGC GG CTGCGGCACGCCCCAGCGGCCTGGCGCCCATGG
 30 CAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAACGCTCCGGGCCCCGTACCCGGAGA
 GCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGAT
 GATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACAT
 GGATGCCTATGAAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACCTCACTGGCTATTTGACAGA
 GGCTGAGAAGTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATA
 35 TTCAACAGGCGAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCGCTAACTGGAGACACCC
 AGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCGGATCATCCAGTTCTCCATGTGTCTTGGAAATG
 ATGCGGTTGCCTACTGCACCTTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCACGGAAGCTGAGTGGAATACA
 GCTGTGAGGAGGCCCTGCATAATAGACTTTTTCCCTGGGGCAACAACTGCAGCCCAAAGGCCA
 GCATTATGCCAACATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAA
 40 GGAAGTGGCCTGTTGATGCCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACG
 CATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAA
 GGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTACATGTGCCATAGGTCTTATT
 GTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTCAATCTGGG
 ATTCCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACCATGGACTGA

45 У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидна заміна може призводити до зміни
 синонімічного кодону у відкритій рамці зчитування з метою узгодження з частотою застосування
 ендегенного кодону, який знаходиться в конкретній гетерологічній клітині, обраної для експресії
 I2S та/або FGE. В альтернативному або додатковому варіанті нуклеотидна заміна може
 призводити до зміни вмісту G+C у відкритій рамці зчитування для того, щоб більше відповідати
 50 середньому вмісту G+C відкритих рамок зчитування, які знаходяться в ендегенних
 нуклеотидних послідовностях гетерологічної клітини-господаря. Нуклеотидна заміна також може
 призводити до зміни полімононуклеотидної області або внутрішньої регуляторної або
 структурної ділянки, яка присутня в послідовності I2S або FGE. Таким чином, розглядається
 велика кількість модифікованих або оптимізованих нуклеотидних послідовностей, включаючи,
 55 без обмежень, нуклеотидні послідовності, які забезпечують підвищену експресію білків I2S
 та/або FGE в прокаріотичній клітині; дріжджовій клітині; клітині комах та в клітині ссавця.

Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнова кислота, кодує білок I2S,
 придатний для цілей цього винаходу, має нуклеотидну послідовність, щонайменше на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %
 60 або більш ідентичну SEQ ID NO:7. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеїнова

кислота, кодуюча білок FGE, придатний для цілей цього винаходу, має нуклеотидну 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:8. Як правило, модифікована нуклеїнова кислота кодує білок I2S та/або FGE з або без змін в амінокислотній послідовності. В разі амінокислотних змін, такі зміни зазвичай не призводять до значної зміни активності білка I2S або FGE.

Експресійні вектори

Нуклеотидну послідовність, кодуючу білок I2S та/або FGE, як описано в цій заявці, можна молекулярно клонувати (вносити) у відповідний вектор для розмноження або експресії в клітині-господарі. Для практичної реалізації цього винаходу можна застосовувати велику кількість експресійних векторів, включаючи, без обмежень, прокаріотичний експресійний вектор; експресійний вектор дріжджів; експресійний вектор комах та експресійний вектор ссавців. Типові вектори, придатні для цілей цього винаходу, включають, але не обмежуються цим, вектори на вірусній основі (наприклад, вектори на основі AAB, вектори на основі ретровірусів, вектори на основі плазмід). У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидні послідовності, кодуючі відповідно білки I2S та FGE, можуть бути внесені до окремих векторів. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеотидні послідовності, кодуючі відповідно білки I2S і FGE, можуть бути внесені до одного й того ж вектору. Як правило, нуклеїнова кислота, кодуюча білок I2S або FGE, функціонально зв'язана з різними регуляторними послідовностями або елементами.

Регуляторні послідовності або елементи

Різні регуляторні послідовності або елементи можна включати в експресійний вектор, який підходить для цілей цього винаходу. Типові регуляторні послідовності або елементи включають, але не обмежуються цим, промотори, енансери, репресори або супресори, 5' нетрансльовані (або некодуючі) послідовностей, інтрони, 3' нетрансльовані (або некодуючі) послідовності.

За використання в цьому документі "промотор" або "промоторна послідовність" являє собою регуляторну область ДНК, здатну зв'язувати РНК полімерази в клітині (наприклад, прямо або за допомогою інших зв'язаних з промотором білків або речовин) та ініціювати транскрипцію кодуючої послідовності. Промоторна послідовність в загальному випадку зв'язана з 3' кінцем за допомогою сайту ініціації транскрипції, тягнеться вгору (у напрямку 5') та містить мінімальну кількість основ або елементів, необхідних для ініціації транскрипції на будь-якому рівні. Промотор може бути функціонально асоційованим або функціонально зв'язаним з послідовностями, керівниками експресії, включаючи енансерні або репресорні послідовності, або з нуклеїновою кислотою, яка повинна експресуватися. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути індукційним. У деяких варіантах реалізації винаходу індукційний промотор може бути однонаправленим або двонаправленим. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути конститутивним промотором. У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути гібридним промотором, в якому послідовність, що містить ділянку управління транскрипцією, отримана з одного джерела, а послідовність, що містить ділянку ініціації транскрипції, отримана з другого джерела. Системи для приєднання контрольних елементів до кодуючої послідовності в трансгені добре відомі в цій галузі техніки (загальні методи молекулярної біології та рекомбінантних ДНК описані в Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, яка включена в цей документ в якості посилання). Комерційні вектори, придатні для внесення трансгену для експресії в різних клітинах-господарях в різних умовах зростання та індукції, також добре відомі в цій галузі техніки.

У деяких варіантах реалізації винаходу для регулювання експресії трансгену в клітині-господарі ссавця можна застосовувати специфічний промотор, такий як, без обмежень, промотор SR α (Takebe et al., *Molec. and Cell. Bio.* 8:466-472 (1988)), негайно-ранній промотор CMV людини (Boshart et al., *Cell* 41:521-530 (1985); Foecking et al., *Gene* 45:101-105 (1986)), промотор CMV людини, промотор CMV5 людини, негайно-ранній промотор CMV мишей, промотор EF1- α , гібридний промотор CMV для специфічної експресії в печінці (наприклад, отриманий шляхом кон'югації негайно-раннього промотору CMV з елементами транскрипції промотору α -1-антитрипсину (HAT) людини або промотору альбуміну (HAL) людини) або промотори для специфічної експресії в гепатомі (наприклад, такі, в яких елементи транскрипції промотору альбуміну людини (HAL; близько 1000 п.о.) або α -1-антитрипсину людини (HAT, близько 2000 п.о.) з'єднані з енансерним елементом α -1-мікроглобуліну людини завдовжки 145 і геном попередника бікуніну (AMBP); HAL-AMBP та HAT-AMBP); рання область промотору SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304-310 (1981)), негайно-ранній промотор *Orgyia pseudotsugata*, промотор тимідинкінази герпесу (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)); або регуляторні послідовності гену металотионеїну (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)). У

деяких варіантах реалізації винаходу промотор ссавця є конститутивним промотором, таким як, без обмежень, промотор гіпоксантин-фосфорибозилтрансферази (HPTR), промотор аденозиндеамінази, промотор піруваткінази, промотор бета-актину, а також інші конститутивні промотори, відомі фахівцям в цій галузі техніки.

5 У деяких варіантах реалізації винаходу для регулювання експресії трансгену в прокаріотичній клітині-господарі можна застосовувати специфічний промотор, такий як, без обмежень, промотор β -лактамази (Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 (1978)); tac-промотор (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); промотор T7, промотор T3, промотор M13 або промотор M16; у дріжджовій клітині-господарі можна застосовувати, без обмежень, промотор GAL1, GAL4 або промотор GAL10, ADH-промотор (промотор алкогольдегідрогенази), PGK-промотор (промотор фосфогліцеролкінази), промотор алкалінфосфатази, промотор гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази III (TDH3), промотор гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази II (TDH2), промотор гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази I (TDH1), промотор піруваткінази (PYK), енолази (ENO) або триозофосфатдегідрогенази (TPI).

У деяких варіантах реалізації винаходу промотор може бути одним з вірусних промоторів, багато з яких здатні регулювати експресію трансгену в декількох типах клітин-господарів, включаючи клітини ссавців. Вірусні промотори, які виявилися здатними управляти конститутивною експресією кодуючих послідовностей в еукаріотичних клітинах, включають, наприклад, промотори вірусу мавп, промотори вірусу простого герпесу, промотори вірусу папіломи, аденовірусні промотори, промотори вірусу імунodefіциту людини (ВІЧ), промотори вірусу саркоми Рауса, промотори цитомегаловірусу (CMV) та довгі кінцеві повтори (ДКП) вірусу мишачого лейкозу Молоні та інших ретровірусів, промотор тимідинкінази вірусу простого герпесу, а також інші вірусні промотори, відомі фахівцям в цій галузі техніки.

25 У деяких варіантах реалізації винаходу генні регуляторні елементи експресійного вектору можуть також включати 5' нетранскрибуючі та 5' нетрансльовані послідовності, що беруть участь в ініціації відповідно транскрипції та трансляції, такі як ТАТА-бокс, кепируюча послідовність, послідовність CAAT, послідовність Козака і т. п. У деяких випадках можуть застосовуватися енхансерні елементи для підвищення рівнів експресії поліпептиду або білку. Приклади енхансерних елементів, які продемонстрували свою функціональність в клітинах ссавців, включають енхансер раннього гену SV40, описаний у Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4: 761, та енхансер/промотор, отриманий з довгого кінцевого повтору (ДКП) вірусу саркоми Рауса (BCP), описаний у Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777, а також цитомегаловірус людини, описаний у Boshart et al., Cell (1985) 41:521. Генні регуляторні елементи експресійного вектору можуть також включати 3' нетранскрибуючі та 3' нетрансльовані послідовності, які беруть участь в термінації, відповідно, транскрипції та трансляції, такі як сигнал поліаденілування (полі А) для стабілізації та процесингу 3' кінця мРНК, яка транскрибується з промотору. Полі А сигнали включають, наприклад, полі А сигнал бета-глобіну кролика, полі А сигнал бичачого гормону зростання, термінаторний/полі А сигнал бета-глобіну курчати або пізню полі А область SV40.

Маркери, що селектуються

Експресійні вектори переважно, але необов'язково, містять щонайменше один маркер, що селектується. У деяких варіантах реалізації винаходу маркер, що селектується, являє собою нуклеотидну послідовність, кодуючу ген стійкості, функціонально зв'язану з одним або більше генетичних регуляторних елементів, що забезпечує можливість клітині-господареві зберігати життєздатність в умовах зростання у присутності цитотоксичних хімічних речовин та лікарських препаратів. У деяких варіантах реалізації винаходу агент, що селектується, можна застосовувати для утримання експресійного вектору всередині клітини-господаря. У деяких варіантах реалізації винаходу агент, що селектується, можна застосовувати для запобігання модифікації (тобто, метилування) та/або виключення трансгенної послідовності в експресійному векторі. У деяких варіантах реалізації винаходу агент, що селектується, застосовують для підтримки епісомної експресії вектору в клітині-господарі. У деяких варіантах реалізації винаходу агент, що селектується, застосовують для того, щоб забезпечити стабільну інтеграцію трансгенної послідовності в геном клітини-господаря. У деяких варіантах реалізації винаходу агент та/або ген стійкості може включати, без обмежень, метотрексат (MTX), дигідрофолатредуктазу (DHFR, патенти США № 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017), ампіцилін, неоміцин (G418), зеоміцин, мікофенолову кислоту або глутамінсинтетазу (GS, патенти США № 5122464; 5770359; 5827739) для еукаріотичної клітини-господаря; тетрациклін, ампіцилін, канаміцин або хлорамфенікол для прокаріотичної клітини-господаря; та URA3, LEU2, HIS3, LYS2, HIS4, ADE8, CUP1 або TRP1 для дріжджової клітини-господаря.

Експресійні вектори можуть бути трансфіковані, трансформовані та трансдуковані в клітину-господаря. Терміни "трансфекція", "трансформація" та "трансдукція", які застосовуються в цьому документі, відносяться до внесення екзогенної нуклеотидної послідовності до клітини-господаря. У деяких варіантах реалізації винаходу експресійні вектори, що містять нуклеотидні послідовності, кодуючі I2S та/або FGE, трансфікують, трансформують та трансдукують в клітину-господаря одночасно. У деяких варіантах реалізації винаходу експресійні вектори, що містять нуклеотидні послідовності, кодуючі I2S та/або FGE, трансфікують, трансформують та трансдукують в клітину-господаря послідовно. Наприклад, спочатку можна трансфікувати, трансформувати або трансдукувати в клітину-господаря вектор, кодуючий білок I2S, а потім трансфікувати, трансформувати або трансдукувати вектор, кодуючий білок FGE, та навпаки. Приклади способів трансформації, трансфекції і трансдукції, які добре відомі в цій галузі техніки, включають ліпосомну доставку, тобто, метод Хоулі-Нельсона із застосуванням ліпофектаміну™ (Gibco BRL), Focus 15:73 (1193), електропорацію, спосіб доставки із застосуванням CaPO₄ Грехема і Ван дер Еба, Virology, 52:456-457 (1978), опосередковану для ДЕАЕ-декстран-опосередковану доставку, мікроін'єкцію, біолістичну доставку часток, полібрен-опосередковану доставку, катіон-опосередковану ліпідну доставку, трансдукцію та інфікування вірусами, такими як, наприклад, ретровірус, лентівірус, аденовірус, адено-асоційований вірус та бакуловірус (у випадку клітин комах). Основні аспекти трансформацій клітин-господарів були описані в цій галузі техніки, наприклад у Axel в патенті США № 4399216; Sambrook, supra, розділи 1-4 та 16-18; Ausubel, supra, розділи 1, 9, 13, 15, і 16. Інформацію про різні способи трансформації клітин ссавців дивіться в Keown et al., Methods in Enzymology (1989), Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990), та Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Після внесення до клітин експресійні вектори можуть стабільно інтегруватися в геном або існувати у вигляді позахромосомних конструкцій. Також вектори можуть бути ампліфіковані, а їх множинні копії можуть існувати в клітині або інтегруватися в геном. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини згідно з винаходом можуть містити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 або більше копій нуклеїнових кислот, кодуючих білок I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини згідно з винаходом можуть містити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 або більше копій нуклеїнових кислот, кодуючих білок FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини згідно з винаходом можуть містити множинні копії (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 або більше) нуклеїнових кислот, кодуючих обидва білки, – I2S та FGE.

Клітини-господарі

Термін "клітини-господарі", які використовуються в цьому документі, відноситься до клітин, які можна застосовувати для отримання рекомбінантного ферменту I2S. Зокрема, клітини-господарі придатні для отримання рекомбінантного ферменту I2S у великих масштабах. Придатні клітки-господарі можуть бути отримані з різних організмів, включаючи, але не обмежуючись цим, ссавців, рослини, птахів (наприклад, пташині системи), комах, дріжджів та бактерій. У деяких варіантах реалізації винаходу клітини-господарі є клітинами ссавців. У деяких варіантах реалізації винаходу придатна клітина-господар не є ендосомальною кислотно-дефіцитною клітиною.

Клітинні лінії ссавців

Відповідно до цього винаходу в якості клітини-господаря можна застосовувати будь-яку клітину або тип клітин ссавців, які можна культивувати і які можуть експресувати поліпептиди. Необмежуючі приклади клітин ссавців, які можна застосовувати відповідно до цього винаходу, включають ембріональні клітини нирок людини 293 (HEK293), клітини HeLa; 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)); 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 Сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клітини карциноми шийки матки людини (HeLa, ATCC CCL 2); клітини нирок собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки сірого щура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легенів людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); пухлина молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; та лінію гепатоми людини (Hep G2). У деяких варіантах реалізації винаходу придатна клітина ссавця не є ендосомальною кислотно-дефіцитною клітиною.

Додатково, відповідно до цього винаходу можна застосовувати будь-яку кількість комерційно

і некомерційно доступних гібридомних клітинних ліній, які експресують поліпептиди або білки. Для фахівця в цій галузі техніки буде очевидне, що гібридомні клітинні лінії можуть вимагати різних умов живлення та/або можуть вимагати різних умов культивування для оптимального зростання та експресії поліпептиду або білку, і відповідно, він зможе за необхідності модифікувати ці умови.

Клітинні лінії, що не належать ссавцем

Відповідно до цього винаходу в якості клітини-господаря можна застосовувати будь-яку клітину або тип клітин, що не належать ссавцям, які можна культивувати і які можуть експресувати поліпептиди. Необмежуючі приклади клітин-господарів і клітинних ліній, що не належать ссавцями, які можна застосовувати відповідно до цього винаходу, включають клітини та клітинні лінії, отримані з *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* та *Yarrowia lipolytica* для дріжджів; *Sodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* та *Manduca sexta* для комах; та *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile* для бактерій; та *Xenopus laevis* з амфібій.

Адаптація до адгезивного або суспензійного вирощування

У певних варіантах реалізації винаходу клітину-господаря для генерації клітинної лінії вибирають на підставі певних переважних характеристик або зростання в конкретних умовах, обраних для культивування клітин. Для фахівця в цій галузі техніки буде очевидне, що такі характеристики можна визначити на підставі відомих характеристик та/або ознак стійкої лінії (тобто, комерційно доступної клітинної лінії з відомими характеристиками) або шляхом емпіричної оцінки. У деяких варіантах реалізації винаходу клітинну лінію можна вибирати за її здатністю до зростання на живлячому шарі клітин. У деяких варіантах реалізації винаходу клітинну лінію можна вибирати за її здатністю до зростання в суспензії. У деяких варіантах реалізації винаходу клітинну лінію можна вибирати за її здатністю до росту у вигляді адгезивного моношару клітин. У деяких варіантах реалізації винаходу такі клітини можна застосовувати з будь-якою ємністю для тканинної культури або будь-якою ємністю, покритою придатним адгезійним субстратом. У деяких варіантах реалізації винаходу придатний адгезійний субстрат вибраний з групи, що складається з колагену (наприклад, колагену I, II, III або IV), желатину, фібронектину, ламініну, вітронектину, фібриногену, BD МатрігеляТМ, матриксу базальної мембрани, дерматансульфат протеоглікану, полі-D-лізину та/або їх комбінацій. У деяких варіантах реалізації винаходу адгезивну клітину-господаря можна вибирати та модифікувати в певних умовах зростання для вирощування в суспензії. Такі способи модифікації адгезивної клітини для вирощування в суспензії відомі в цій галузі техніки. Наприклад, клітину можна кондиціювати для вирощування в суспензійній культурі шляхом поступового видалення тваринної сироватки з живильного середовища протягом певного часу.

Вибір та оцінка клітинної лінії

Відповідно до цього винаходу клітини, сконструйовані для експресії рекомбінантного білку I2S, вибирають за їх здатністю виробляти рекомбінантний білок I2S в комерційно прийнятному масштабі. Зокрема, сконструйовані клітини згідно з цим винаходом здатні виробляти рекомбінантний білок I2S на високому рівні та/або з високою ферментативною активністю. У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини за культивування в умовах клітинного культивування (наприклад, в стандартних суспензійних або адгезивних умовах культивування у великих масштабах) можуть виробляти фермент I2S в кількості рівній або більшій ніж близько 5 пікограмів/клітину/день (наприклад, більший, ніж близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 пікограмів/клітину/день). У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини за культивування в умовах клітинного культивування (наприклад, в стандартних суспензійних або адгезивних умовах культивування у великих масштабах) здатні виробляти фермент I2S в кількості, що знаходиться в діапазоні, який становить близько 5-100 пікограмів/клітину/день (наприклад, близько 5-90 пікограмів/ клітину/день, близько 5-80 пікограмів/ клітину/день, близько 5-70 пікограмів/клітину/день, близько 5-60 пікограмів/клітину/день, близько 5-50 пікограмів/клітину/день, близько 5-40 пікограмів/клітину/день, близько 5-30 пікограмів/клітину/день, близько 10-90 пікограмів/клітину/день, близько 10-80 пікограмів/клітину/день, близько 10-70 пікограмів/клітину/день, близько 10-60 пікограмів/клітину/день, близько 10-50 пікограмів/клітину/день, близько 10-40 пікограмів/клітину/день, близько 10-30 пікограмів/клітину/день, близько 20-90 пікограмів/клітину/день, близько 20-80 пікограмів/клітину/день, близько 20-70 пікограмів/клітину/день, близько 20-60 пікограмів/клітину/день, близько 20-50 пікограмів/клітину/день, близько 20-40 пікограмів/клітину/день, близько 20-30 пікограмів/клітину/день).

Як обговорювалося вищим, зазвичай на ферментативну активність I2S впливає посттрансляційна модифікація консервативного цистеїну (наприклад, амінокислоти 59) у формілгліцин. У загальному випадку ця посттрансляційна модифікація відбувається у ендоплазматичному ретикулумі під час синтезу білку та каталізує FGE. Ферментативна активність I2S зазвичай позитивно корелює зі ступінню формілгліцинової модифікації I2S. Наприклад, препарат I2S, що містить відносно велику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно високою специфічною ферментативною активністю; а препарат I2S, що містить відносно невелику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно низькою специфічною ферментативною активністю.

Додатково передбачається, що співвідношення між білком I2S і FGE або мПНК також може впливати на формілгліцинову модифікацію отриманого рекомбінантного білку I2S. У деяких варіантах реалізації винаходу I2S і FGE, які експресуються у придатній клітині, характеризуються різними рівнями експресії білку та мПНК. У деяких варіантах реалізації винаходу рівень експресії білка або мПНК I2S щонайменше у 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9 або 10 разів вище, ніж рівень білка або мПНК для FGE. У деяких варіантах реалізації винаходу рівень експресії рекомбінантного білка або мПНК FGE щонайменше у 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9 або 10 разів вище, ніж рівень білка або мПНК для I2S.

У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини за культивування в умовах клітинного культивування (наприклад, в стандартних суспензійних або адгезивних умовах культивування у великих масштабах) можуть виробляти білок I2S, що містить щонайменше близько 50 % (наприклад, щонайменше близько 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %) залишків цистеїну, відповідних Cys59 з SEQ ID NO:1, перетворених у Cα-формілгліцин (FGly). У деяких варіантах реалізації винаходу придатні клітини за культивування в умовах клітинного культивування (наприклад, в стандартних суспензійних або адгезивних умовах культивування у великих масштабах) можуть виробляти фермент I2S, що містить щонайменше близько 50 % (наприклад, щонайменше близько 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %) залишків цистеїну, відповідних Cys59 з SEQ ID NO:1, перетворених у Cα-формілгліцин (FGly), і в кількості рівній або більшій ніж близько 5 пікограмів/клітину/день (наприклад, більшій ніж близько 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 пікограмів/клітину/день).

Відсоток конверсії у FGly

Для визначення відсотку конверсії у FGly відомі та можуть бути застосовані різні способи. У загальному випадку відсоток конверсії у формілгліцин (%ФГ) можна розрахувати, використовуючи наступну формулу:

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

Наприклад, 50 % ФГ означає те, що половина очищеного рекомбінантного I2S ферментативно неактивна і не надає терапевтичного ефекту. Для розрахунку %ФГ можна застосовувати різні способи. Наприклад, можна застосовувати пептидне картування. Коротко, білок I2S можна розщепити на короткі пептиди за допомогою протеаз (наприклад, трипсину або хімотрипсину). Короткі пептиди можна розділити та отримати їх характеристики за допомогою хроматографії (наприклад, HPLC) так, щоб можна було визначити природу та кількість кожного пептиду (зокрема, пептиду, до складу якого входить позиція, відповідна позиції 59 зрілого людського I2S) порівняно з контролем (наприклад, білком I2S без конверсії у FGly або білка I2S з 100 % конверсією у FGly). Можна визначити кількість пептидів, що містять FGly (відповідну кількості активних молекул I2S), і загальну кількість пептидів, що містять FGly і Cys (відповідну загальній кількості молекул I2S), і розрахувати співвідношення, що відображає %ФГ.

Специфічна активність

Як обговорювалося вище, зазвичай на ферментативну активність I2S впливає посттрансляційна модифікація консервативного цистеїну (наприклад, амінокислоти 59) у формілгліцин. Таким чином, ферментативна активність I2S зазвичай позитивно корелює зі ступінню формілгліцинової модифікації I2S. Наприклад, препарат I2S, що містить відносно велику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно високою специфічною ферментативною активністю; а препарат I2S, що містить відносно невелику кількість формілгліцинових модифікацій, зазвичай характеризується відносно низькою специфічною ферментативною активністю.

Для фахівця в цій галузі техніки вочевидь, що ферментативну активність рекомбінантного білку I2S, який виробляється клітинами згідно з цим винаходом, можна виміряти різними *in vitro* та *in vivo* методами. У деяких варіантах реалізації винаходу виміряна за допомогою методу визначення *in vitro* активності вивільнення сульфату із застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду придатна ферментативна активність отриманого рекомбінантного білку I2S становить щонайменше близько 20 Е/мг, 30 Е/мг, 40 Е/мг, 50 Е/мг, 60 Е/мг, 70 Е/мг, 80 Е/мг, 90 Е/мг або 100 Е/мг. У деяких варіантах реалізації винаходу виміряна за допомогою методу визначення *in vitro* активності вивільнення сульфату з застосуванням в якості субстрату гепарин дисахариду придатна ферментативна активність отриманого рекомбінантного білку I2S знаходиться в діапазоні, який становить близько 20-100 Е/мг (наприклад, близько 20-90 Е/мг, близько 20-80 Е/мг, близько 20-70 Е/мг, близько 20-60 Е/мг, близько 20-50 Е/мг, близько 20-40 Е/мг, близько 20-30 Е/мг, близько 30-100 Е/мг, близько 30-90 Е/мг, близько 30-80 Е/мг, близько 30-70 Е/мг, близько 30-60 Е/мг, близько 30-50 Е/мг, близько 30-40 Е/мг, близько 40-100 Е/мг, близько 40-90 Е/мг, близько 40-80 Е/мг, близько 40-70 Е/мг, близько 40-60 Е/мг, близько 40-50 Е/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, рН 6, для усунення пригнічення фосфат-іонами в буферній суміші. Потім зразки розводять до 0,075 мг/мл реакційним буфером (10 мМ ацетату Na, рН 4,4) та інкубують впродовж 2 г за 37(С 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 за 100(С впродовж 3 хв. Аналіз проводять, використовуючи аналітичну колонку Dionex IonPac AS18 з передколункою IonPac AG18. Застосовують ізократичний метод з 30 мМ гідроксиду калію за 1,0 мЛ/хв впродовж 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 мкмолу сульфату, що вивільняється за годину, а концентрацію білку визначають за допомогою вимірів A280.

У деяких варіантах реалізації винаходу ферментативну активність рекомбінантного білку I2S, що виробляється клітинами згідно з цим винаходом, можна також визначити за допомогою багатьох інших способів, відомих у 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 близько 2 Е/мг, 4 Е/мг, 6 Е/мг, 8 Е/мг, 10 Е/мг, 12 Е/мг, 14 Е/мг, 16 Е/мг, 18 Е/мг або 20 Е/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 близько 0-50 Е/мг (наприклад, близько 0-40 Е/мг, близько 0-30 Е/мг, близько 0-20 Е/мг, близько 0-10 Е/мг, близько 2-50 Е/мг, близько 2-40 Е/мг, близько 2-30 Е/мг, близько 2-20 Е/мг, близько 2-10 Е/мг, близько 4-50 Е/мг, близько 4-40 Е/мг, близько 4-30 Е/мг, близько 4-20 Е/мг, близько 4-10 Е/мг, близько 6-50 Е/мг, близько 6-40 Е/мг, близько 6-30 Е/мг, близько 6-20 Е/мг, близько 6-10 Е/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 міліодинація активності відповідає кількості ферменту, необхідного для перетворення одного наномолу 4-MUF-SO₄ в 4-MUF за одну хвилину за 37 °С. Як правило, згенеровані пробними зразками I2S з відомою активністю середні одиниці флуоресценції (СОФ) можна застосовувати для побудови стандартної кривої, яку можна використовувати для розрахунку ферментативної активності зразку, який представляє інтерес.

Середовища та умови для культивування клітин

Для отримання рекомбінантного білку I2S за допомогою сконструйованих клітин згідно з цим винаходом можна застосовувати різні середовища та умови для культивування клітин. Наприклад, рекомбінантний білок I2S можна отримати в середовищі, що містить сироватку, або безсироватковому середовищі. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S отримують в безсироватковому середовищі. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S отримують в нетваринному середовищі, тобто, середовищі, в якому

відсутні компоненти тваринного походження. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S отримують в хімічно визначеному середовищі. Термін "хімічно визначене живильне середовище", який використовується в цьому документі, відноситься 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. В деяких випадках хімічно визначене середовище містить один або більше білків (наприклад, білкові чинники зростання або цитокіни). У деяких випадках хімічно визначене живильне середовище містить один або більше білкового гідролізату. В інших випадках хімічно визначене живильне середовище є безбілковим середовищем, тобто, безсироватковим середовищем, яке не містить білків, гідролізату або компонентів з невідомим складом.

У деяких варіантах реалізації винаходу хімічно визначене живильне середовище може бути доповнене одним або більше компонентами тваринного походження. Такі компоненти тваринного походження включають, але не обмежуються цим, фетальну телячу сироватку, кінську сироватку, козлину сироватку, ослячу сироватку, людську сироватку та сироваткові білки, такі як альбумін (наприклад, бичачий сироватковий альбумін або людський сироватковий альбумін).

Для отримання рекомбінантних білків I2S у великих 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 рекомбінантний білок I2S отримують за допомогою клітин, які культивуються в суспензії. У деяких варіантах реалізації винаходу рекомбінантний білок I2S отримують за допомогою адгезивних клітин.

Типові середовища для клітин та умови культивування описані в розділі Прикладів. Додаткові типові способи та композиції для отримання рекомбінантного білку I2S описані в попередній заявці під назвою "Способи та композиції для отримання рекомбінантної ідуронат-2-сульфатази", поданої на реєстрацію одночасно з цим документом, повний зміст якої включений в цей документ в якості посилання.

Очищення білку I2S, що експресується

Для очищення або виділення білку I2S, отриманого відповідно до різних описаних в цьому документі способів, можна застосовувати різні способи реалізації винаходу. У деяких варіантах реалізації винаходу білок I2S, що експресується, секритується в середовищі та, отже, клітини та інші тверді частки можна видалити шляхом, наприклад, центрифугування або фільтрування на першому етапі процесу очищення. В альтернативному або додатковому варіанті білок I2S, що експресується, зв'язаний з поверхнею клітини-господаря. У цьому варіанті реалізації винаходу з метою очищення клітин-господарів, що експресують поліпептид або білок, лізують. Лізис клітин-господарів ссавців можна здійснювати будь-яким з багаточисельних способів, добре відомих фахівцям в цій галузі техніки, включаючи фізичне руйнування за допомогою скляних гранул та створення умов з високим рівнем рН.

Білок I2S можна виділяти та очищати за допомогою стандартних способів, включаючи, але не обмежуючись цим, хроматографію (наприклад, іонообмінну, аффіну, ексклюзійну та гідроксиапатитову хроматографію), гель-фільтрацію, центрифугування або диференціальну розчинність, преципітацію етанолом або за допомогою будь-якого іншого доступного способу очищення білків (дивіться, наприклад, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S. J. and Hames, B. D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; and Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997, які всі включені в цей документ в якості посилання). Зокрема, в разі імуноаффіної хроматографії білок можна виділити шляхом зв'язування його з аффіною колонкою, що містить антитіла, які були отримані проти цього білку та зафіксовані на стаціонарній підкладці. В альтернативному варіанті за допомогою стандартних рекомбінантних способів до білку можна приєднати аффінні мітки, такі як послідовність зовнішньої оболонки інфлуенції, полі-гістидин або глутатіон-S-трансферазу, для того, щоб полегшити очищення за пропускання через відповідну аффіну колонку. Для того, щоб понизити або виключити деградацію поліпептиду або білку під час процесу очищення на будь-якому його етапі можна додавати інгібітори протеаз, такі як фенолметилсульфоніл фторид (ФМСФ), леупептин або Апротинін. Інгібітори протеаз особливо необхідні в разі лізування клітин з метою виділення та очищення поліпептиду або білку, які експресуються.

Типові способи очищення описані в розділі Прикладів. Додаткові способи очищення описані в попередній заявці під назвою "Очищення рекомбінантного білку I2S", поданої на реєстрацію

одночасно з цим документом, повний зміст якої включений в цей документ в якості посилання.

Фармацевтична композиція та введення

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.

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

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, відноситься 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 з цим винаходом відноситься 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, відноситься до області між третім і четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями та, точніше, до L2-S1 ділянки хребта.

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.

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)).

У цьому винаході передбачається як одноразове, так і багаторазове введення терапевтично ефективного кількості рекомбінантного I2S або фармацевтичної композиції, що його містить, описаного 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, лизосомній 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).

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.

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, парфумерну 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 їхню активність. У деяких варіантах реалізації винаходу застосовують водорозчинний носій, придатний для внутрішньовенного введення.

Композиція або лікарський препарат за необхідності може також містити невеликі кількості змочуючих та емульсуючих агентів або буферних агентів для зміни рН. Композиція може бути рідким розчином, суспензією, емульсією, пігулкою, пілюлем, капсулою, препаратом сповільненого вивільнення або порошком. Також композиція може бути виготовлена у вигляді суппозиторії з традиційними зв'язуючими речовинами і носіями, такими як тригліцериди. Препарат для перорального вживання може містити стандартні носії, такі як фармацевтичного

ступеню чистоти маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, полівінілпіролідон, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію і так далі.

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, її можна розвести в інфузійному флаконі, що містить стерильну фармацевтичного ступеню чистоти воду, сольовий розчин або декстрозу/воду. Якщо композиція призначена для ін'єкційного введення, до неї може додаватися ампула зі стерильною водою для ін'єкції або сольовим розчином так, що інгредієнти можна змішувати перед введенням.

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 лизосомних ферментних рецепторів або їх активності, яка призводить до лікування лизосомної 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 лизосомного фермента), 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.

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 певної фармацевтичної речовини, яка застосовується; певна 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.

Додаткові типові фармацевтичні композиції та способи введення описані в публікації згідно з 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", поданій на реєстрацію 30 березня 2012 р., повний зміст яких включений у цей документ в якості посилання.

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. Генерація оптимізованої клітинної лінії, яка коекспресує рекомбінантні I2S та FGE

В цьому прикладі проілюстрована типова оптимізована клітинна лінія, коекспресуюча рекомбінантні I2S та FGE, яку можна застосовувати для отримання рекомбінантного білку I2S. Для фахівця в цій галузі техніки очевидно, що існує велика кількість альтернативних підходів,

експресійних векторів та способів клонування.

Типовою зрілою формою людського ферменту ідуронат-2-сульфатази (I2S) є 525-амінокислотний глікопротеїн, який для ферментативної активації піддається активному процесингу та посттрансляційній модифікації, такий як глікозилювання або конверсія цистеїну у формілгліцин (Фігура 1). У клітинах ссавців консервативні залишки цистеїну у ферменті I2S (тобто, в амінокислоті 59) перетворюються у формілгліцин за допомогою формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE). Конверсія цистеїну у формілгліцин на активній ділянці ферменту I2S є важливим етапом утворення активної форми людського ферменту сульфатази. Метою цього експерименту було створення оптимізованої клітинної лінії, коекспресуючої I2S та FGE, для отримання активного рекомбінантного I2S.

На Фігурі 2 наведені типові конструкції для коекспресії I2S та FGE. Наприклад, експресійні одиниці I2S та FGE можуть знаходитися на окремих векторах, а окремі вектори можна трансфікувати спільно або окремо (Фігура 2A). В альтернативному варіанті експресійні одиниці I2S та FGE можуть міститися на одному й тому ж векторі (Фігура 2B). В одній конфігурації I2S та FGE можуть міститися на одному й тому ж векторі, але регулюватися окремими промоторами, і називатися окремими цистронами (Фігура 2B(1)). В альтернативному варіанті I2S та FGE можуть бути сконструйовані у вигляді транскрипційно зв'язаних цистронів, що означає, що I2S та FGE сконструйовані у вигляді відкритої рамки зчитування під управлінням одного промотору (Фігура 2B(2)). Як правило, ділянка внутрішньої посадки рибосоми (IRES) сконструйована так, щоб зробити можливою кеп-незалежну ініціацію трансляції матричною РНК (Фігура 2B(2)).

Людську клітинну лінію сконструювали для коекспресії людського білку I2S з амінокислотною послідовністю, наведеною в SEQ ID NO:2, і людського формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE) з амінокислотною послідовністю, наведеною в SEQ ID NO:6.

SEQ ID NO: 2

> Повнорозмірний попередник ідуронат-2-сульфатази

MPPPRRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQ
LASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSV
GKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDK
QSTEQAIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPW
MDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG
WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLPDPSASQLMEPGRQSMDLVE
LVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPS
DIPQWNSDKPSLKDIDKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYND
SQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:6

Повнорозмірний попередник людського FGE:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHS
SAAAHRYREANAPGPVPGERQLAHSKMVPIAGVFTMGTDPPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAY
EVSNTFEFEKFVNSTGYLTEAEKFGDSFVFEGLMLSEQVKTNIIQQAFAAPWWLPVKGANWRHPEGPD
STILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANI
WQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGYGLYNIVGNAWEWTSDDWWTVHHSVEETLNPKGPPSG
KDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLFRCADRLPTMD

Для генерації експресуючої I2S клітинної лінії клітини стабільно трансфікували кодон-оптимізованою нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO. 7), що кодує білок I2S з амінокислотною послідовністю, наведеною у SEQ ID NO:2, і нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO. 8), що кодує людський фермент FGE, наведений у SEQ ID NO. 6.

SEQ ID NO: 7

> Кодон-оптимізована ідуронат-2-сульфатаза (IDS) Homo sapiens, варіант транскрипту 1, мРНК

ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCAGCGTG
TGCGTGGCCCTGGGCAGCGAGACCCAGGCCAACAGCACCACCGACGCCCTGAACGTGCTGCTG
ATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGCGACAAGCTGGTGCGCAGCCCC
AACATCGACCACTGGCCAGCCACAGCCTGCTGTTCCAGAACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTG
TGCGCCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTGACCGGCCGCGCCCGACACCACCCGCCTGTACGAC
TTCAACAGCTACTGGCGCGTGCACGCCGGAACCTTCAGCACCATCCCCCAGTACTTCAAGGAGA
ACGGCTACGTGACCATGAGCGTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCG
ACGACAGCCCCTACAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCACCCCGAGCAGCGAGAAGTACGAGAACA
CCAAGACCTGCCCGCGGCCCGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGCCCGCTGGACGTG
CTGGACCTGCCCGAGGGCACCCCTGCCCGACAAGCAGACGACCGAGCAGGCCATCCAGCTGCT
GGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCTTCTTCCTGGCCGTGGGCTACCACAAGCCCCACAT

CCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCCAGAAGCTGTACCCCCTGGAGAACATCACCCCTGGCCCCC
 GACCCCGAGGTGCCCCGACGGCCTGCCCCCGTGGCCTACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAG
 CGCGAGGACGTGCAGGCCCTGAACATCAGCGTGCCCTACGGCCCCATCCCCGTGGACTTCCAG
 CGCAAGATCCGCCAGAGCTACTTCGCCAGCGTGAGCTACCTGGACACCCAGGTGGGCCGCCTG
 5 CTGAGCGCCCTGGACGACCTGCAGCTGGCCAACAGCACCATCATCGCCTTACCAGCGACCAC
 GGCTGGGCCCTGGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAACTTCGACGTGGCCACCCA
 CGTGCCCTGATCTTCTACGTGCCCGGCCGACCGCCAGCCTGCCCGAGGCCGCGGAGAAAGCT
 GTTCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCCAGCCAGCTGATGGAGCCCGGCCGCGAGAGCAT
 GGACCTGGTGGAGCTGGTGAGCCTGTTCCCCACCCTGGCCGGCCTGGCCGGCCTGCAGGTGC
 10 CCCCCCGCTGCCCCGTGCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGCGAGGGCAAGAACCTGCTGA
 AGCACTTCCGCTTCCGCGACCTGGAGGAGGACCCCTACCTGCCCGGCAACCCCCGCGAGCTGA
 TCGCCTACAGCCAGTACCCCCGCCCCAGCGACATCCCCCAGTGGAAACGCGACAAGCCCCAGCC
 TGAAGGACATCAAGATCATGGGCTACAGCATCCGACACTCGACTACCCGTGTGGGT
 GGGCTTCAACCCCGACGAGTTCCTGGCCAACCTTCAGCGACATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTC
 15 GTGGACAGCGACCCCTGCAGGACCACAACATGTACAACGACAGCCAGGGCGGCGACCTGTTT
 CAGCTGCTGATGCCCTAG

SEQ ID NO: 8

> Повнорозмірний попередник формілгліцин-утворюючого ферменту (FGE) Homo sapiens, мРНК

20 ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTCCTCT
 TGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGCG
 GGCGCGGGGTCCCTTGC GGTTCTTTCGGCTGCGGCACGCCCCAGCGGCCTGGCGCCCATGG
 CAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAACGCTCCGGGGCCCCGTACCCGGAGA
 GCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGAT
 25 GATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACAT
 GGATGCCTATGAAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAAGTCAACTGGCTATTTGACAGA
 GGCTGAGAAGTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATA
 TTCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCGCTAACTGGAGACACCC
 AGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCATCCAGTTCTCCATGTGTCCTGGAATG
 30 ATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCACGGAAGCTGAGTGGGAATACA
 GCTGTGCGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCCTGGGGCAACAACTGCAGCCCCAAGGCCA
 GCATTATGCCAACATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAA
 GGAAGTGGCCTGTTGATGCCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACG
 CATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAA
 35 GGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTACATGTGCCATAGGTCTTATT
 GTTACCGTATCGCTGTGCTGCTGCGGAGCAGAACACACTGATAGCTCTGCTTCGAATCTGGG
 ATTCCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACCATGGACTGA

Обидві нуклеотидні послідовності, які кодують I2S та FGE, регулюються промотором CMV людини. Трансляція I2S мРНК призводить до синтезу 550-амінокислотного повнорозмірного білку I2S (SEQ ID NO:2), що містить 25-амінокислотний сигнальний пептид. Сигнальний пептид видалюється, та розчинний фермент секритується з клітини.

Кодуючу послідовність неоміцин фосфотрансферази (нео) бактерій та/або ген бластидици S деамінази (BSD) застосовували для того, щоб зробити можливою селекцію трансфікованих клітин, застосовуючи аналог неоміцину G418 і бластидицин, відповідно. Додатково, застосовували ген мишачої дигідрофолатредуктази (DHFR) в I2S- та/або FGE-кодуючому(их) векторі(ах) для того, щоб зробити можливим виділення клітинних ліній, що містять підвищену кількість копій I2S- та/або FGE-кодуючих послідовностей за допомогою селекції з використанням метотрексату (MTX).

Клітини, які виробляють I2S, виділяли та проводили відбір за чутливістю до лікарського препарату для того, щоб виділити клітини з підвищеною кількістю копій трансфікованих генів I2S та/або FGE. Кількісний аналіз I2S проводили за допомогою ELISA.

Клітинну популяцію також піддавали процедурі покрокового відбору в метотрексаті (MTX) для того, щоб виділити клітини з підвищеним виробленням I2S. Вироблення I2S відстежували під час селекції із застосуванням MTX за допомогою ELISA.

Після декількох циклів культивування декілька виробляючих I2S клонів піддавали суспензійній адаптації в безсироватковому середовищі з покроковим зниженням від DMEM, що містить 10 % телячу сироватку, до безсироваткового хімічно визначеного середовища. За клонування способом серійного розведення було отримано декілька окремих популяцій клонів. Колонії відбирали за результатами аналізу ферментативної активності I2S і ELISA. Дві стабільні клітинні лінії 2D і 4D демонстрували високий відсоток виживання та підвищену експресію I2S і

були відібрані для додаткового дослідження.

Приклад 2. Оцінка стабільних клітинних ліній, які коекспресують рекомбінантні I2S та FGE

Проводили додаткові експерименти для отримання характеристик двох клітинних ліній 2D і 4D, які коекспресують I2S та FGE.

5 Специфічна активність

Спочатку оцінювали специфічну активність ферменту I2S. Аналіз специфічної активності ферменту I2S, що виробляється клітинними лініями 2D і 4D, проводили за допомогою флуоресцентного аналізу з 4-MUF. Коротко, в цьому аналізі оцінюють гідроліз субстрату I2S – 4-метилумбеліферил-сульфату (4-MUF-SO₄). Після розщеплювання субстрату 4-MUF-SO₄ I2S 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. У цьому експерименті очищений білок I2S, отриманий з людських клітинних ліній I2S-AF 2D і 4D, інкубували з розчином 4-метилумбеліферил-сульфату (4-MUF-SO₄), сіллю калію, Sigma Cat. # M-7133). Калібрування в поданому аналізі проводили, застосовуючи групи контрольних зразків, що містять комерційно доступний фермент I2S, розведений в матковому розчині у співвідношенні 1:100, 1:200 і 1:20000. Ферментний аналіз проводили за 37 °C за допомогою відкаліброваного флуорометру. Застосовуючи значення флуоресценції, отримані для кожного еталонного зразка, відсотковий коефіцієнт варіації визначали за допомогою наступного виразу:

20

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

Потім відсоткові значення KB застосовували для розрахунку скоректованої середньої флуоресценції для кожного зразка для того, щоб визначити реєстровану ферментативну активність, виражену в мЕ/мЛ, за допомогою наступної формули:

25

$$\text{мЕ/мЛ} = (CE) \left(\frac{1 \text{ нмоль/Л}}{10 \text{ ЕФ}} \right) \left(\frac{1 \text{ Л}}{10^3 \text{ мЛ}} \right) \left(\frac{2,1 \text{ мЛ}}{0,01 \text{ мЛ}} \right) \left(\frac{1 \text{ год}}{60 \text{ хв}} \right) \left(\frac{1 \text{ мЕ}}{1 \text{ нмоль}} \right) (КР)$$

СЕФ = негативна скоректована середня флуоресценція

30

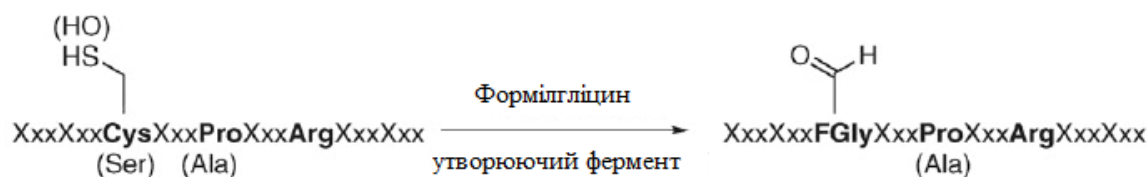
КР – кратність розведення

Одна міліюдиниця активності відповідає кількості ферменту, необхідного для перетворення одного наномоля 4-метилумбеліферил-сульфату в 4-метилумбеліферил за одну хвилину за 37 °C.

Відсоток конверсії у формілгліцин

35

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:



40

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

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

45

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

Для розрахунку %ФГ застосовували пептидне картування. Коротко, рекомбінантний білок I2S розщеплювали на короткі пептиди за допомогою протеаз (наприклад, трипсину або хімотрипсину). Короткі пептиди розділяли та отримували їхні характеристики за допомогою HPLC. Пептид, до складу якого входить позиція, відповідна позиції 59 зрілого людського I2S,

50

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 кількості активних молекул I2S), та загальну кількість пептидів, що містять FGly та Cys (відповідну загальній кількості молекул I2S), і розрахувати співвідношення, що відображає %ФГ.

Кореляція між відсотком конверсії у FGly та специфічною активністю

Типова кореляція між відсотком конверсії у FGly та специфічною активністю проілюстрована на Фігурі 3. Як видно, дані показують, що більш високий відсоток конверсії у FGly призводить до більш високої ферментативної активності I2S.

Карта гліканів

Проводили визначення композиції гліканів рекомбінантного білку I2S, що виробляється клітинними лініями 2D і 4D. Кількісну оцінку композиції гліканів проводили за допомогою аніонообмінної хроматографії. Як описано нижче, карта гліканів рекомбінантного I2S, отримана в цих умовах, складається з семи пікових груп, які елюються відповідно до зростання кількості негативних зарядів, щонайменше частково належать глікоформам сialової кислоти та манозо-6-фосфату, отриманих в результаті ферментного розщеплювання. Коротко, очищений рекомбінантний I2S, отриманий за застосування безсироваткового способу клітинного культивування (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 сialової кислоти, (2) алкалінфосфатазою впродовж 2 годин за 37 ± 1 °C для повного вивільнення залишків манозо-6-фосфату, (3) алкалінфосфатазою + 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 передколonoю Dionex CarboPac PA1. У кожному аналізі використовували еталонні групи сialової кислоти та манозо-6-фосфату в діапазоні, що становить від 0,4 до 2,0 нмоль. Застосовували ізократичний спосіб із застосуванням 48 мМ ацетату натрію в 100 мМ гідроксиду натрію протягом як мінімум 15 хвилин за швидкості потоку 1,0 мл/хв за зовнішньої температури 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 4, на типовій карті гліканів для I2S, що виробляється клітинними лініями 2D і 4D, 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.

Приклад 3. Безсироваткове суспензійне клітинне культивування

Цей приклад демонструє те, що можна розробити спосіб безсироваткового суспензійного культивування у великих масштабах для культивування оптимізованої клітинної лінії для отримання рекомбінантного I2S.

Система для безсироваткового суспензійного культивування

Коротко, культуру для посіву отримували, застосовуючи клітинну лінію 2D або 4D з Прикладу 1. Клітини переносили в 250 мл качалку для тканинного культивування, що містить безсироваткове хімічно визначене середовище для розмноження із додаванням MTX для селекції, доводили бікарбонатом натрію до pH 7,3 і вирощували за 37°C за 5 % CO₂ впродовж декількох днів. Коли культура досягала достатньої клітинної щільності та життєздатності, вихідну культуру для посіву використовували для інокуляції першої групи для поетапної експансії клітинної культури в 500 мл качалках для тканинного культивування, а потім – в 1 Л качалках для тканинного культивування.

Експансію періодичної культури проводили шляхом перенесення кожної з 1 Л культур у 10 Л Cellbag bioreactor® (Wave Europe) та додавання середовища для експансії. Після досягнення достатньої клітинної щільності додавали нове середовище для експансії та вирощували клітини до достатньої щільності. 10 Л Cellbag переносили в систему Wave bioreactor® (Wave Europe) та модифікували умови культивування, щоб забезпечити можливість зростання за безперервної перфузії середовища. Проводили доставку середовища для зростання та експансії, а зразки збирали для аналізу pH, глутаміну, глутамату, глюкози, амонію, лактату, pCO₂ та осмолярності у відсутності метаболітів.

Після досягнення достатньої клітинної щільності всю 10 Л клітинну культуру переносили у 50

Л Wave Cellbag bioreactor®, що містить свіже середовище для експансії, та вирощували до достатньої щільності, використовуючи систему Wave bioreactor®.

Потім проводили експансію клітин, використовуючи 200 Л одноразовий біореактор та центрифужний перфузійний пристрій (Centritech® CELL II unit, Pneumatic Scale Corporation), який було сконструйовано для концентрації клітин та очищення середовища для повторного циклу під час перфузійно-опосередкованого клітинного культивування. Середовище для експансії (доведене до pH 7,10) інокулювали частиною 50 Л культури та вирощували до достатньої клітинної щільності.

Далі частину 200 Л культури використовували для посіву у 2000 Л одноразовий біореактор та центрифужний перфузійний пристрій (Centritech® CELL II unit, Pneumatic Scale Corporation) в середовище для серійного виробництва (доведену до pH 7,20). Клітини вирощували в умовах для періодичного зростання. Після двох днів вирощування умови коректували з урахуванням безперервної перфузії до досягнення перехідної фази. Клітини вирощували в умовах для перфузійного зростання впродовж 24-годинної перехідної фази.

Для виробничої фази використовували два юніти Centritech CELL II. Виробничу фазу починали приблизно через 24 години після початку перехідної фази та продовжували впродовж необхідного періоду часу, регулюючи швидкість течії.

Хоча певні компоненти, композиції та способи, вказані в цьому документі, були описані відповідно до конкретних варіантів реалізації винаходу, подані приклади слугують виключно для ілюстрації компонентів винаходу та не обмежують його.

Однина за вживання в цьому документі в описі винаходу та у формулі винаходу, якщо чітко не вказане інше, має на увазі також множинні об'єкти. Пункти формули винаходу або опису, які містять "або" між одним або більше членів групи, вважаються задовільними, якщо один, більше ніж один або всі члени групи присутні, задіяні або будь-яким іншим способом пов'язані з цим продуктом або процесом, якщо не вказане зворотнє або інше не очевидне із контексту. Винахід включає варіанти реалізації, в яких лише один член з групи присутній, задіяний або будь-яким іншим способом пов'язаний з цим продуктом або процесом. Винахід також включає варіанти реалізації, в яких більше за один або всі члени групи присутні, задіяні або будь-яким іншим способом пов'язані з цим продуктом або процесом. Крім того, варто розуміти, що винахід включає в себе всі варіації, комбінації та перестановки, в яких один або більше обмежень, елементів, пунктів, описових термінів і так далі з одного або більше перерахованих пунктів формули винаходу вставлені в інший пункт, залежний від того ж основного пункту (або, залежно від змісту, від будь-якого іншого пункту), якщо не вказане інше або якщо для фахівця в цій галузі техніки очевидно, що може виникнути суперечність або неузгодженість. Там, де елементи представлені у вигляді списку (наприклад, у вигляді групи Маркуша або в подібному форматі), варто розуміти, що кожна підгрупа елементів також розкривається, а будь-який(і) елемент(и) можна видалити з групи. Слід розуміти, що, в загальному випадку, там, де йдеться про те, що винахід або аспекти винаходу містить/містять конкретні елементи, ознаки і так далі, певні варіанти реалізації винаходу або аспекти винаходу складаються або переважно складаються з таких елементів, ознак і так далі. Для спрощення в цьому документі такі варіанти реалізації винаходу не були окремо детально описані в кожному з випадків. Також слід розуміти, що будь-який варіант реалізації або аспект винаходу може бути повністю виключений з формули винаходу незалежно від того, присутнє це конкретне виключення в описі винаходу чи ні. Публікації, вебсайти та інші довідкові матеріали, що згадуються в цьому документі для опису рівня техніки винаходу і додаткових подробиць стосовно його практичної реалізації, включені в цей документ в якості посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Boldog, Ferenc
Heartlein, Mike

<120> КЛІТИНИ ДЛЯ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ ІДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗИ

<130> 2006685-0340

<150> 61/666,719

<151> 2012-06-29

<160> 8

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 525

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
20 25 30

Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
35 40 45

Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val
50 55 60

Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
65 70 75 80

Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
85 90 95

Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
100 105 110

His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
115 120 125

Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
130 135 140

Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
145 150 155 160

Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu

340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 550

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
20 25 30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
35 40 45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
50 55 60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
275 280 285

Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val
290 295 300

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

Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
325 330 335

Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp
340 345 350

Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala
355 360 365

Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe
370 375 380

Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu
385 390 395 400

Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu
405 410 415

Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys
420 425 430

Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu
435 440 445

Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser
450 455 460

Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro
465 470 475 480

Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp
485 490 495

Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala
500 505 510

Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp
515 520 525

Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu
530 535 540

Phe Gln Leu Leu Met Pro
545 550

<210> 3

<211> 312

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
20 25 30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
35 40 45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
50 55 60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile

275 280 285
 Pro Val Asp Phe Gln Glu Asp Gln Ser Ser Thr Gly Phe Arg Leu Lys
 290 295 300
 Thr Ser Ser Thr Arg Lys Tyr Lys
 305 310
 <210> 4
 <211> 343
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
 20 25 30
 Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
 35 40 45
 Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
 50 55 60
 Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
 65 70 75 80
 Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
 85 90 95
 Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
 100 105 110
 Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
 115 120 125
 Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
 130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
275 280 285

Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val
290 295 300

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

Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
325 330 335

Phe Leu Met Arg Thr Asn Thr
340

<210> 5
<211> 341

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly Ser
1 5 10 15

Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser Ala
20 25 30

Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val Pro
35 40 45

Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala Gly
50 55 60

Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly Glu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala Tyr
85 90 95

Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly Tyr
100 105 110

Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly Met
115 120 125

Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala Ala
130 135 140

Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu Gly
145 150 155 160

Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His Val
165 170 175

Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg Leu
180 185 190

Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His Asn

195 200 205

Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His Tyr
210 215 220

Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu Asp
225 230 235 240

Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly Tyr
245 250 255

Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp Trp
260 265 270

Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly Pro
275 280 285

Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys His
290 295 300

Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn Thr
305 310 315 320

Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp Arg
325 330 335

Leu Pro Thr Met Asp
340

<210> 6

<211> 374

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Val Cys Gly Arg Cys Pro Glu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Cys Gly Ala Ala
20 25 30

Gly Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly
35 40 45

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

Ala Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val
65 70 75 80

Pro Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala
85 90 95

Gly Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly
100 105 110

Glu Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala
115 120 125

Tyr Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly
130 135 140

Tyr Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly
145 150 155 160

Met Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala
165 170 175

Ala Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu
180 185 190

Gly Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His
195 200 205

Val Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg
210 215 220

Leu Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His
225 230 235 240

Asn Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His
245 250 255

Tyr Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu
260 265 270

Asp Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly
275 280 285

Tyr Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp
290 295 300

Trp Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly
305 310 315 320

Pro Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys
325 330 335

His Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn
340 345 350

Thr Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp
355 360 365

Arg Leu Pro Thr Met Asp
370

<210> 7

<211> 1653

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgccccgcg cccgcaccgg ccgcggcctg ctgtggctgg gcctggtgct gagcagcgtg 60

tgcgtggccc tgggcagcga gaccaggcc aacagacca ccgacgcct gaacgtgctg 120

ctgatcatcg tggacgacct gcgccccagc ctgggctgct acggcgacaa gctggtgcgc 180

agccccaaca tcgaccagct ggccagccac agcctgctgt tccagaacgc ctgcgccag 240

caggccgtgt gcgccccag ccgcgtgagc ttctgaccg gccgccgccc cgacaccacc 300

cgccgtgacg acttcaacag ctactggcgc gtgcagccg gcaactcag caccatcccc 360

cagtacttca aggagaacgg ctacgtgacc atgagcgtgg gcaaggtgtt ccaccccggc 420

atcagcagca accacaccga cgacagcccc tacagctgga gcttcccccc ctaccacccc 480
 agcagcgaga agtacgagaa caccaagacc tggcgggcc ccgacggcga gctgcacgcc 540
 aacctgctgt gccccgtgga cgtgctggac gtgcccagg gcacctgcc cgacaagcag 600
 agcaccgagc aggccatcca gctgctggag aagatgaaga ccagcgccag ccccttcttc 660
 ctggccgtgg gctaccacaa gcccacatc cccctccgt accccaagga gtccagaag 720
 ctgtaccccc tggagaacat caccctggcc cccgaccccg aggtgcccga cggcctgccc 780
 cccgtggcct acaaccctg gatggacatc cgccagcgcg aggacgtgca ggcctgaac 840
 atcagcgtgc cctacggccc catccccgtg gacttccagc gcaagatccg ccagagctac 900
 ttgccagcg tgagctacct ggacaccag gtggggcgcc tctgagcgc cctggacgac 960
 ctgcagctgg ccaacagcac catcatgcc ttaccagcg accacggctg ggccctgggc 1020
 gagcacggcg agtgggcaa gtacagcaac ttgacgtgg ccaccacgt gccctgatc 1080
 ttctacgtgc ccggccgac cgccagcctg cccgaggccg gcgagaagct gttccctac 1140
 ctggacccct tcgacagcg cagccagctg atggagcccg gccgccagag catggacctg 1200
 gtggagctgg tgagcctgt cccaccctg gccggcctgg ccggcctgca ggtgcccccc 1260
 cgctgccccg tgcccagctt ccacgtggag ctgtgcccg agggcaagaa cctgctgaag 1320
 caattccgt tccgcgacct ggaggaggac ccctacctgc ccggcaacc ccgcgagctg 1380
 atgcctlaca gccagtlacc ccgccccagc gacatcccc agtggaaacag cgacaagccc 1440
 agcctgaagg acatcaagat catgggttac agcatccgca ccatcgacta ccgtacacc 1500
 gtgtgggtgg gcttcaacc cgacgagttc ctggccaact tcagcgacat ccacgccggc 1560
 gagctgtact tcgtggacag cgacccccctg caggaccaca acatgtlaca cgacagccag 1620
 ggcggcgacc tgttccagct gctgatgcc tag 1653

<210> 8

<211> 1125

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggctgcgc ccgcactagg gctggtgtgt ggacgttgc ctgagctggg tctctcttc 60

ttgtctgtgc tctctctgt gctgtgtgga gcggcaggga gccaggaggc cgggaccggt 120

gcgggcgagg ggtcccttgc gggttcttgc ggctgcggca cgccccagcg gcctggcgcc 180

```

catggcagtt cggcagccgc tcaccgatac tcgcgggagg ctaacgctcc gggccccgta    240
cccgagagc ggcaactcgc gcactcaaag atgggtccca tcctgctgg agtatttaca    300
atgggcacag atgactctca gataaagcag gatggggaag cacctgcgag gagagtact    360
attgatgcct ttacatgga tgcctatgaa gtcagtaata ctgaattga gaagttgtg    420
aactcaactg gctatttgac agaggctgag aagtttggcg actcctttgt cttgaaggc    480
atgttgagtg agcaagtga gaccaatatt caacaggcag ttgcagctgc tcctggtgg    540
ttacctgtga aaggcgctaa ctggagacac ccagaagggc ctgactctac tattctgcac    600
agggcggatc atccagttct ccatgtgtcc tggaatgatg cggttgccta ctgcacttg    660
gcaggaagc ggctgccac ggaagctgag tgggaataca gctgtcagg aggcctgcat    720
aatagacttt tcccctgggg caacaaactg cagcccaaag gccagcatta tgccaacatt    780
tggcaggcg agtttccgt gaccaacact ggtgaggatg gctccaagg aactgcgcct    840
gttgatgcct tcctcccaa tggttatggc ttatacaaca tagtggggaa cgcattggaa    900
tggacttcag actggtggac tgttcatcat tctgtgaag aaacgcttaa cccaaaaggt    960
ccccctctg ggaaagaccg agtgaagaaa ggtggatcct acatgtgcca taggtcttat    1020
tgttacaggt atcgtgtgc tgcctggagc cagaacacac ctgatatgct tgcctcgaat    1080
ctgggattcc gctgtgcagc cgaccgctg cccacatgg actga                    1125

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Клітина, що містить:

першу нуклеїнову кислоту, яка кодує біологічно активний білок ідуронат-2-сульфатази (I2S), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну SEQ ID NO: 1; та другу нуклеїнову кислоту, яка кодує біологічно активний білок формілгліцинутворюючого ферменту (FGE), що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну SEQ ID NO: 5,
- 10 при цьому перша та/або друга нуклеїнова кислота є екзогенними, а клітина при культивуванні в умовах клітинного культивування виробляє білок I2S, що містить щонайменше близько 70 % залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO: 1, перетворених у C α -формілгліцин (FGly), причому рівень білка ідуронат-2-сульфатази, який експресує клітина, в 0,3-10 разів вище
- 15 рівня білка формілгліцинутворюючого ферменту, який експресує ця клітина.
2. Клітина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що клітина при культивуванні в умовах клітинної культури виробляє білок I2S, в якому щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 97 % залишків цистеїну, які відповідають Cys59 з SEQ ID NO: 1, перетворені у C α -формілгліцин (FGly).
- 20 3. Клітина за будь-яким із пп. 1-2, яка **відрізняється** тим, що

(а) перша та/або друга нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з промотором hCMV, та/або

(б) перша нуклеїнова кислота кодує білок I2S, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну SEQ ID NO: 1, та/або

(в) перша нуклеїнова кислота кодує білок I2S, що має амінокислотну послідовність, ідентичну
- 25 SEQ ID NO: 1, та/або

(г) друга нуклеїнова кислота кодує білок FGE, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну SEQ ID NO: 5.

(д) друга нуклеїнова кислота кодує білок FGE, що має амінокислотну послідовність, ідентичну SEQ ID NO: 5.

- 5 4. Клітина за будь-яким із пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що перша нуклеїнова кислота містить послідовність, щонайменше на 70 % ідентичну SEQ ID NO: 7, та/або друга нуклеїнова кислота містить послідовність, щонайменше на 70 % ідентичну SEQ ID NO: 8.
- 10 5. Клітина за будь-яким із пунктів 1-4, яка **відрізняється** тим, що як перша, так і друга нуклеїнові кислоти є екзогенними.
6. Клітина за будь-яким із пп. 1-5, яка **відрізняється** тим, що клітина є клітиною ссавця, причому, необов'язково, клітина ссавця є клітиною людини або клітиною CHO.
7. Клітина за будь-яким із пп. 1-6, яка **відрізняється** тим, що клітина є такою, що адаптується до суспензійної культури.
- 15 8. Спосіб одержання рекомбінантного білка ідуронат-2-сульфатази (I2S), який включає культивування клітини за будь-яким із попередніх пунктів в таких умовах, в яких рекомбінантні білки I2S та FGE коекспресуються в клітині.
9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що клітину культивують у великих масштабах.
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що культивування у великих масштабах являє собою процес, який проходить у біореакторі, причому, необов'язково, (1) процес, який проходить у біореакторі, є перфузійним процесом та/або (2) об'єм біореактора вибраний з 10 Л, 200 Л, 500 Л, 1000 Л, 1500 Л або 2000 Л.
- 20 11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що культивування у великих масштабах являє собою процес, який проходить в ролерному флаконі.
12. Спосіб за будь-яким із пп. 8-11, який **відрізняється** тим, що (а) клітину культивують у безсироватковому середовищі, або (б) клітину культивують у суспензії.
- 25 13. Спосіб за будь-яким із пп. 8-12, який **відрізняється** тим, що спосіб додатково включає етап очищення рекомбінантного білка I2S.

```

SEQ ID NO: 1  1  Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp
21  Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp
41  Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala
61  Pro Ser Arg Bal Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
81  Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu
101 Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His
121 Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr
141 Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
161 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala
181 Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr
201 His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu
221 Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
241 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr
261 Gly Pro ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser

```

Фіг.1А

281 Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala **Asn**
 301 Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
 321 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly
 341 Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp
 361 Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser
 381 Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 401 Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Clu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg
 421 Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln
 441 Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile
 461 Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
 481 Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala **Asn** Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val
 501 Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr **Asn** Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe
 521 Gln Leu Leu Met Pro **Asn** **Cys**

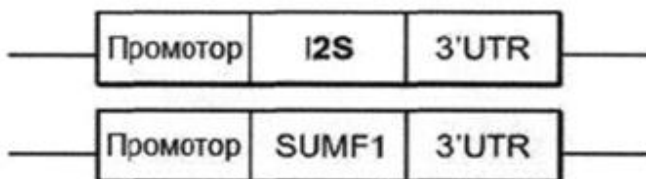
- вказує на ділянки N-зв'язаного глікозлювання

- типова ділянка конверсії цистеїну

Фіг.1В

Варіанти коекспресії I2S та SUMF1

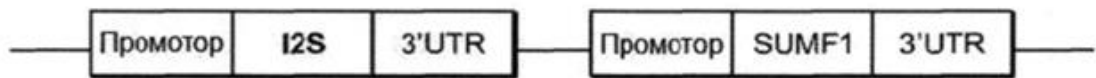
Експресійні одиниці на окремих векторах (котрансфекція або послідовні трансфекції)



Фіг.2А

Експресійні одиниці на одному векторі (одна трансфекція)

1) Окремі цистони



2) Транскрипційно зв'язані цистони

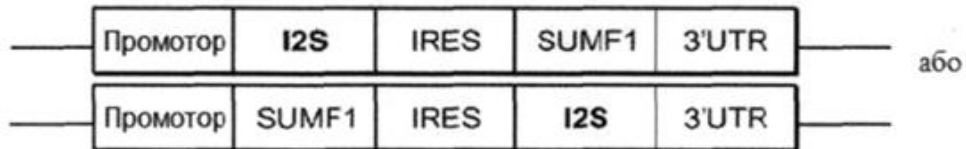


Fig.2B

Кореляція між специфічною активністю та коефіцієнтом конверсії у формігліцин

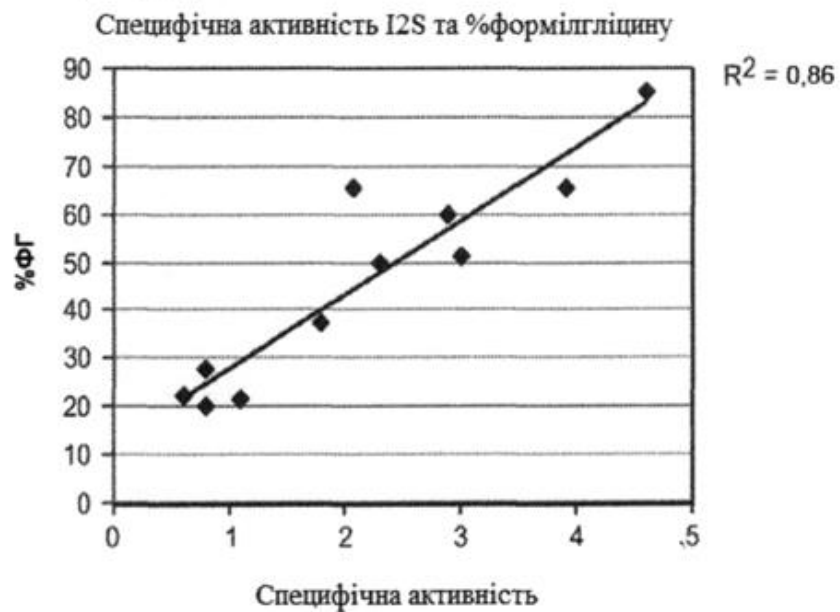


Fig.3

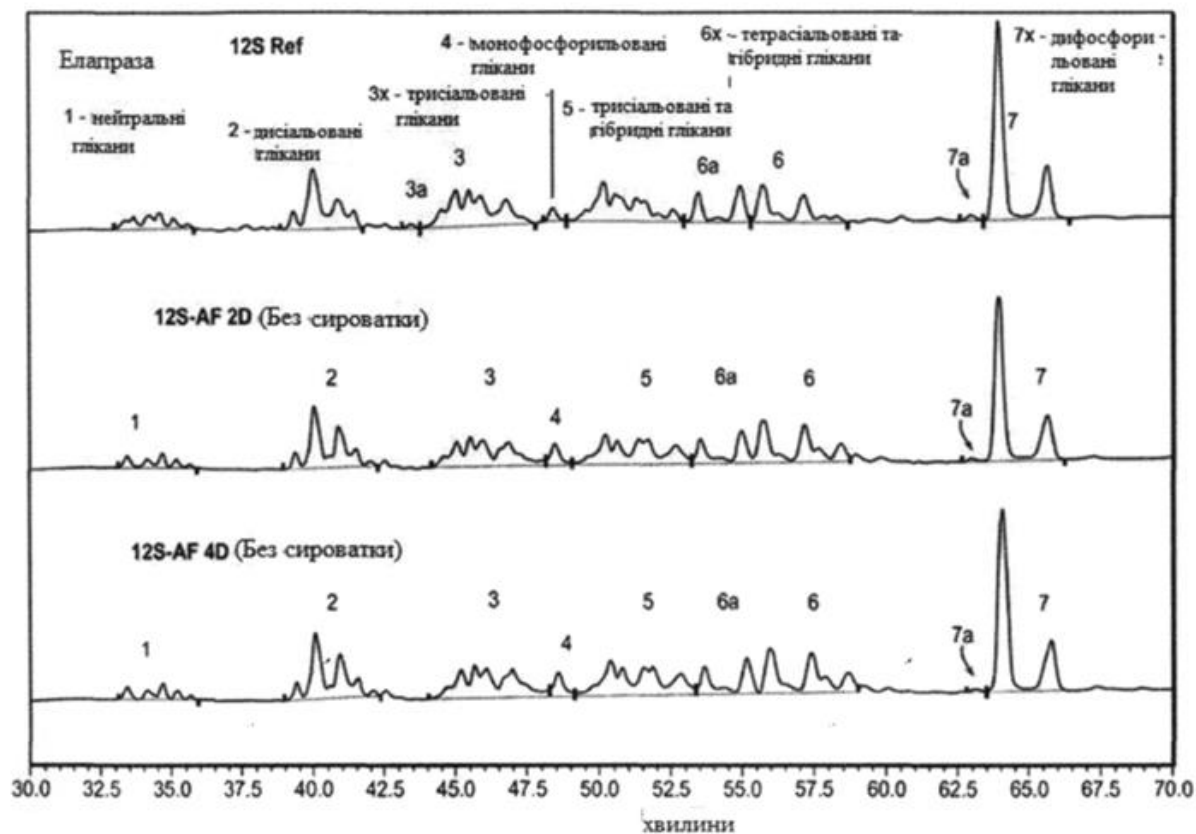


Fig.4

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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