



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119857** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C12N 9/40 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 05455	(73) Власник(и):	ДЖЕНЗАИМ КОРПОРЕЙШН , 500 Kendall Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America (US)
(22) Дата подання заявки:	22.10.2014	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.08.2019	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 5356804 A, 18.10.1994 Enhanced sialylation and in vivo efficacy of recombinant human α -galactosidase through in vitro glycosylation / Youngsoo Sohn, Jung Mi Lee, Heung-Rok Park et al. // BMB Reports. – 2013. – Vol. 46 (3). – P. 157-162 US 6083725 A, 04.07.2000 A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease / Karen Lee, Xiaoying Jin, Kate Zhang et al. // Glycobiology. – 2003. - Vol. 13 (4). – P. 305-313 Human α -galactosidase A: characterization of the N-linked oligosaccharides on the intracellular and secreted glycoforms overexpressed by Chinese hamster ovary cells / Fumito Matsuura, Masaya Ohta, Yiannis A. Ioannou et al. // Glycobiology. – 1998. - Vol. 8 (4). - P. 329–339 Ioannou Y. A. Overexpression of human α - galactosidase a results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion / Yiarmis A. Ioannou, David E Bishop, and Robert J. Desnick // The journal of cell biology. – 1992. – Vol. 119 (5). – P. 1137-1150
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/894,879, 61/901,942		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	23.10.2013, 08.11.2013		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.07.2016, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.08.2019, Бюл.№ 16		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/061789, 22.10.2014		
(72) Винахідник(и):	Лі Карен (US), Хванг Кристофер (US), Демарія Кристин (US)		

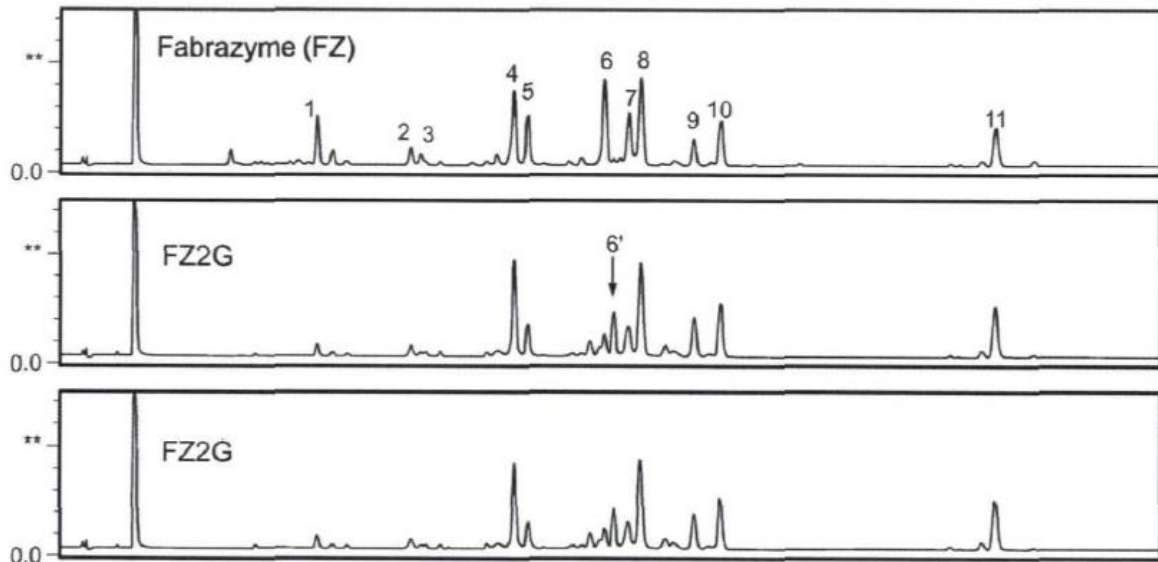
(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ БІЛОК АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗИ-А ЛЮДИНИ (rhAGA)

(57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини (rhAGA), що має певний відсотковий вміст N-зв'язаних олігосахаридів, а саме певний відсотковий вміст:

UA 119857 C2

моносіалільованих олігосахаридів, біс-манозо-6-фосфатвмісних олігосахаридів, бісіалільованих фукозовмісних олігосахаридів, трирозгалужених трисіалільованих олігосахаридів форми 2, нейтрально заряджених олігосахаридів, моносіалільованих фукозовмісних олігосахаридів, бісіалільованих олігосахаридів, трирозгалужених трисіалільованих олігосахаридів форми 1, манозо-6-фосфатвмісних олігосахаридів, монофосфорилованих олігосахаридів, тетрасіалільованих олігосахаридів, моносіалільованих та монофосфорилованих олігосахаридів. Також винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить вказаний рекомбінантний білок, способу лікування хвороби Фабрі та способу зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта.



Фіг. 20

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет відносно попередньої заявки на патент США № 61/894879, поданої 23 жовтня 2013 р., і попередньої заявки на патент США № 61/901942, поданої 8 листопада 2013 р.; повний зміст яких включено до даного документа шляхом посилання.

5 Галузь техніки

Дана заявка відноситься до галузі біотехнології та, більш конкретно, до отримання рекомбінантних глікопротеїнів (наприклад, рекомбінантної α -галактозидази-А) і до лікування лізосомних хвороб накопичення (наприклад, хвороби Фабрі) у суб'єкта.

Передумови винаходу

10 Лізосомні хвороби накопичення складають групу з понад 40 порушень, які є результатом дефектів у генах, що кодують ферменти, які руйнують гліколіпідні або полісахаридні продукти виділення в ліпосомах клітин. Ферментативні продукти, наприклад, цукри й ліпіди, потім переробляються на нові продукти. Кожне з цих порушень є результатом спадкової аутосомальної або пов'язаної з хромосомою Х рецесивної ознаки, яка впливає на рівні ферментів у ліпосомах. Звичайно, біологічна або функціональна активність цих ферментів
15 знижена або відсутня в клітинах і тканинах вражених індивідуумів. Перелік типових лізосомних хвороб накопичення й асоційованих дефіцитів ферментів показаний на фігурі 1 та описаний у таблиці 1 патенту США № 6066626. При таких хворобах дефіцит ферментної функції створює прогресувальне системне відкладення ліпідного або вуглеводного субстрату в ліпосомах клітин
20 в організмі, що з часом призводить до втрати функції органу та смерті.

Хвороба Фабрі являє собою лізосомну хворобу накопичення, спричинену дефіцитом лізосомного ферменту α -галактозидази-А. Дефіцит цієї лізосомної гідролази призводить до прогресувального відкладення глікосфінголіпідгліботриазилцераміду (GL3) і споріднених ліпідів у більшості тканин організму. Відкладення GL3 у першу чергу знаходять в ендотелії судин.
25 Прогресувальне ендотеліальне накопичення GL3 призводить до ішемії та інфаркту в органах, таких як нирка, серце або головний мозок, спричиняючи нестерпний біль, ниркову недостатність і серцеву та цереброваскулярну хворобу. Середня тривалість життя хворих на хворобу Фабрі, яких не лікували ферментнозамісною терапією, через ниркові, серцеві й/або церебральні ускладнення судинної хвороби складає 50 років для чоловіків і 70 років для жінок (Lidove et al.,
30 Int. J. Clin. Pract. 61:293-302, 2007).

Рекомбінантні білки для застосування у медичному лікуванні часто отримують методами клітинних культур, що передбачають застосування рідкого середовища, яке містить продукти крові (наприклад, сироватку крові відмінних від людини тварин). Забруднення фармацевтичних продуктів, що містять рекомбінантні білки, стало проблемою біотехнологічної індустрії (Nims, BioProcessing J. 10:4-10, 2011; Plavsic et al., BioProcessing J. 9:6-12, 2011; Plavsic et al., Dev. Biol. Stand 99:95- 109, 1999). Наприклад, присутність ряду різних вірусів в таких фармацевтичних продуктах, пояснюється, в деяких випадках, продуктом крові (наприклад, сироваткою крові відмінних від людини тварин), присутнім у рідкому середовищі, яке застосовують для культивування клітин, що продукують рекомбінантний білок. Приклади контамінантів, що були
40 знайдені у культурах клітин з продукуванням рекомбінантного білка та які, як вважають, спричинені використанням продуктів тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин, або білки сироватки тварин), описані в даному документі. Застосування безсироваткового середовища або середовища без продуктів тваринного походження у культурі клітин з продукуванням рекомбінантного білка є корисним, оскільки таке середовище для культивування є краще визначеним і спрощеним, має знижений ступінь контамінантів, усуває або знижує ризик забруднення або рівень контамінантів у культурі клітин з продукуванням рекомбінантного білка й призводить до більш низької вартості продукування рекомбінантного білка із застосуванням культури клітин.

Короткий опис винаходу

50 Даний винахід ґрунтується, щонайменше частково, на відкритті того, що білки (наприклад, ферменти, наприклад, α -галактозидази-А) зі зміненим (наприклад, поліпшеним) профілем глікозилювання можуть бути отримані із застосуванням способів, описаних в даному документі. Таким чином, в даному документі представлені білки α -галактозидази-А зі зниженою варіабельністю у глікоформах, зі зниженим ризиком або рівнем забруднення (наприклад, зниженим ризиком або рівнем вірусного забруднення) і/або зі зміненими та поліпшеними профілями глікозилювання (наприклад, у порівнянні з раніше виготовленими ферментами для ферментнозамісної терапії), фармацевтичні композиції і набори, що містять один або декілька з цих білків α -галактозидази-А (наприклад, фармацевтичні композиції, що мають знижену варіабельність у глікоформах і/або знижений ризик або рівень забруднення (наприклад,
60 знижений ризик або рівень вірусного забруднення)), способи створення клітини ссавця,

застосовної для рекомбінантної експресії глікопротеїну (наприклад, α -галактозидази-A), способи отримання рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, α -галактозидази-A), способи лікування хвороби Фабрі й способи зниження рівня в сироватці крові глоботриаозилцераміду у суб'єкта, а також способи підвищення рівня α -галактозидази-A у лізосомі в клітині ссавця (наприклад, в клітині *in vitro* або в клітині у суб'єкта). Також представлені вектори експресії, що включають послідовність, яка кодує білки α -галактозидази-A.

В даному документі представлені рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини (rhAGA), що мають одну або обидві зі структурних ознак: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 1,5%; і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6- фосфат-вмісні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 9%. Наприклад, білок rhAGA за п. 1 може мати структурні ознаки: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 1,5%; і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфатні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 9%. За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 1,3% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 1,0%, або від приблизно 0,1% до приблизно 0,7%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 8,5% (наприклад, більш ніж приблизно 9,0%).

Білки rhAGA, представлені в даному документі, можуть додатково мати одну або декілька зі структурних ознак, вибраних з групи: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 13,5%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж приблизно 2,0%; і відношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж приблизно 3,0.

Наприклад, білок rhAGA, представлений в даному документі, може додатково мати структурні ознаки: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 13,5%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж приблизно 2,0%; і відношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж приблизно 3,0. За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 13,8% (наприклад, більш ніж приблизно 14,0%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж приблизно 4% (наприклад, більш ніж приблизно 6%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж приблизно 3,2 (наприклад, більш ніж приблизно 3,4).

Білки rhAGA, представлені в даному документі, можуть додатково мати одну або декілька структурних ознак, вибраних з групи: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,9%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 5,3%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 1, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 9,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо- 6-фосфат-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 1% до приблизно 7,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 14,8%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалільовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 4,9%; і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані й монофосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 8,2%. Наприклад, білок rhAGA, описаний в даному документі, може мати чотири або більше зі структурних ознак, вибраних з групи: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою

нейтрально заряджені олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,9%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалізовані олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 5,3%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалізовані олігосахариди форми 1, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 9,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 1% до приблизно 7,0%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 14,8%; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалізовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 4,9%; і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані й монофосфосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 8,2%. За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди, який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані фукозо-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 1,0% до приблизно 2,0% (наприклад, від приблизно 1,5% до приблизно 2,0%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалізовані олігосахариди, який становить від приблизно 3,0% до приблизно 5,0% (наприклад, від приблизно 4,0% до приблизно 5,0%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалізовані олігосахариди форми 1, який становить від приблизно 0,5% до приблизно 8,0% (наприклад, від приблизно 0,5% до приблизно 5,0%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, який становить від приблизно 4% до приблизно 6,9% (наприклад, від приблизно 5% до приблизно 6,8%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 15% (наприклад, більш ніж приблизно 16%). За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалізовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 6%. За деякими варіантами здійснення білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані й монофосфосфорильовані олігосахариди, який становить більш ніж приблизно 8,5% (наприклад, більш ніж приблизно 9,0%).

Білки rhAGA, представлені в даному документі, можуть мати одну або обидві з наступних властивостей: (i) підвищений ендоцитоз в клітині ссавця, що експресує білок-рецептор манозо-6-фосфату, у порівнянні з Fabrazyme® і (ii) підвищену афінність до білка-рецептора манозо-6-фосфату, у порівнянні з Fabrazyme®. Наприклад, білки rhAGA, представлені в даному документі, можуть мати (i) підвищений ендоцитоз в клітині ссавця, що експресує білок-рецептор манозо-6-фосфату, у порівнянні з Fabrazyme® і (ii) підвищену афінність до білка-рецептора манозо-6-фосфату, у порівнянні з Fabrazyme®.

Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, можуть не мати детектований рівень або не мати білок, ліпід, вуглевод, нуклеїнову кислоту та контамінант (наприклад, будь-який з контамінантів, описаних у даному документі), присутні у продукті тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або продукт крові тварин).

Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи безбілкового, безсироваткового та середовища з визначеним хімічним складом. Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки безбілкове й/або середовище з визначеним хімічним складом. Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи, що складається з безбілкового, безсироваткового середовища з визначеним хімічним складом, та який виділяють із застосуванням інтегрованого та безперервного процесу. У деяких варіантах здійснення інтегрований та безперервний процес включає стадії: (а) забезпечення рідкого середовища для культивування, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, що практично не

містить клітин, де рідке середовище для культивування подають у першу хроматографічну систему з кількома колонками (MCCS1); (b) захоплення білка rhAGA у рідкому середовищі із застосуванням MCCS1, де елюат MCCS1, що містить рекомбінантний терапевтичний білок, безперервно подають у другу хроматографічну систему з кількома колонками (MCCS2); і (c) очищення та доочищення рекомбінантного терапевтичного білка із застосуванням MCCS2, де елюат з MCCS2 являє собою лікарську речовину rhAGA і де процес є інтегрованим та протікає безперервно з рідкого середовища для культивування у елюат з MCCS2, який являє собою лікарську речовину rhAGA. У деяких варіантах здійснення MCCS1 і/або MCCS2 виконують дві різні елементарні операції. У деяких варіантах здійснення застосування MCCS1, або MCCS2, або обох, передбачає перемикання колонок. У деяких варіантах здійснення MCCS1 виконує елементарні операції захоплення рекомбінантного білка та інактивації вірусів. У деяких варіантах здійснення MCCS2 виконує елементарні операції очищення й доочищення рекомбінантного терапевтичного білка. У деяких варіантах здійснення у MCCS1 і/або MCCS2 використовують щонайменше дві хроматографічні колонки. У деяких варіантах здійснення MCCS1 є першою періодичною протиточною хроматографічною системою (PCCS1), наприклад, PCCS1, що включає PCCS з чотирма колонками. У деяких варіантах здійснення три з чотирьох колонок у PCCS з чотирма колонками (у варіанті здійснення PCCS1) виконують елементарну операцію захоплення рекомбінантного терапевтичного білка з рідкого середовища для культивування. У деяких варіантах здійснення елюат, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, із трьох з чотирьох колонок з чотирма колонками PCC1 (у варіанті здійснення PCCS1) подають у четверту колонку PCCS з чотирма колонками. У деяких варіантах здійснення четверта колонка PCCS з чотирма колонками (у варіанті здійснення PCCS1) виконує елементарну операцію інактивації вірусів шляхом утримування елюату, що містить рекомбінантний терапевтичний білок, при низькому рН для інактивації вірусів. У деяких варіантах здійснення передбачають регулювання рН елюату з четвертої колонки PCCS з чотирма колонками із застосуванням поточного резервуару для регулювання буфера до того, як елюат з четвертої колонки PCCS з чотирма колонками подають у PCCS2. У деяких варіантах здійснення PCCS2 містить хроматографічні колонки та хроматографічну мембрану. У деяких варіантах здійснення три хроматографічні колонки у PCCS2 виконують елементарну операцію очищення rhAGA, представленого у даному документі, з елюату PCCS1 за допомогою катіон- або аніонобмінної хроматографії. У деяких варіантах здійснення елюат з трьох хроматографічних колонок у PCCS2 подають на хроматографічну мембрану у PCCS2. У деяких варіантах здійснення хроматографічна мембрана у PCCS2 виконує елементарну операцію доочищення білка rhAGA, представленого у даному документі в елюаті з трьох хроматографічних колонок у PCCS2, за допомогою катіон- або аніонобмінної хроматографії. У деяких варіантах здійснення хроматографічна мембрана у PCCS2 виконує елементарну операцію доочищення шляхом катіонного обміну. У деяких варіантах здійснення потік крізь хроматографічну мембрану у PCCS2 та омивання її може виконувати лікарська речовина rhAGA.

Також представлені фармацевтичні композиції, що містять будь-який білок rhAGA, описаний в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій. Наприклад, фармацевтична композиція може бути складена для внутрішньовенного, внутрішньоартеріального, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, підшкірного або внутрішньоперитонеального введення. За деякими варіантами здійснення фармацевтична композиція має концентрацію rhAGA від приблизно 4 мг/мл до приблизно 6 мг/мл (наприклад, приблизно 5 мг/мл). У деяких прикладах фармацевтична композиція є стерильним, ліофілізованим порошком. За деякими варіантами здійснення фармацевтично прийнятний носій може являти собою один або декілька засобів, вибраних з групи маніту, натрію фосфату одноосновного, моногідрату, натрію фосфату двоосновного й гептагідрату.

Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може не мати детектований рівень або не мати білок, ліпід, вуглевод, нуклеїнову кислоту та контамінант (наприклад, будь-який з контамінантів, описаних у даному документі), присутні у продукті тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або продукт крові тварин).

Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може включати білок rhAGA, який продукується у культурі клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи безбілкового, безсироваткового і середовища з визначеним хімічним складом. Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може включати білок rhAGA, представлений у даному документі, який продукується у культурі клітин, у якій використовували тільки безбілкове середовище для культивування та/або

середовище для культивування з визначеним хімічним складом. Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може містити білок rhAGA, представлений у даному документі, який продукується культурою клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи середовищ для культивування: безбілкового, безсироваткового та з визначеним хімічним складом, та який виділяють із застосуванням інтегрованого і безперервного процесу (наприклад, із застосуванням будь-якого з ілюстративних інтегрованого та безперервного процесів, описаних у даному документі).

Також представлені вектори експресії, що містять послідовність, яка кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини; промоторну послідовність, функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності, що кодує білок α -галактозидази-А людини; послідовність, що кодує пептид білка CD52 людини зі стартовим кодоном TTG, функціонально пов'язаним з 5'-кінцем послідовності, що кодує білок α -галактозидази-А людини; і послідовність, що кодує полі(А) сайт розпізнавання, функціонально пов'язаний з 3'-кінцем послідовності, що кодує білок α -галактозидази-А людини. За деякими варіантами здійснення промоторна послідовність вибрана з групи промотора gpS21 хом'яка, промотора β -актину хом'яка й раннього промотора SV40; і послідовністю, що кодує полі(А) сайт розпізнавання, є послідовність полі(А) сайту розпізнавання раннього SV40. За деякими варіантами здійснення вектор експресії додатково містить послідовність, що кодує глутамінсинтетазу людини або собаки чи дигідрофолатредуктазу. За деякими варіантами здійснення 5'-кінець послідовності, що кодує глутамінсинтетазу людини або собаки, функціонально пов'язаний з раннім промотором SV40, а 3'-кінець послідовності, що кодує глутамінсинтетазу людини або собаки чи дигідрофолатредуктазу, функціонально пов'язаний з раннім інтроном SV40 і полі (А) сигнальною послідовністю.

Також представлені способи створення лінії клітин ссавця, застосовної для рекомбінантної експресії глікопротеїну, що передбачають (а) забезпечення лінії залежних від сироватки крові іморталізованих клітин ссавця; (b) послідовне культивування лінії клітин ссавця в: (1) середовищі для культивування клітин, що має першу концентрацію (1X) сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів; (2) середовищі для культивування клітин, що має від приблизно 0,2X до приблизно 0,3X концентрацію сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів; і (3) середовищі для культивування клітин, що має від приблизно 0,01X до приблизно 0,08X сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів; (c) створення культур одноклітинних субклонів з культури після (b); (d) відбір субклону з (c), що має прийнятні трансфекційну ефективність, клітинний ріст у безсироватковому середовищі для культур і рекомбінантну експресію білка; (d) культивування відібраного субклону з (d) у безбілковому, безсироватковому середовищі з визначеним хімічним складом протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів); (e) створення культур одноклітинних субклонів з культури після (d) і (f) відбір субклону з (e), що має прийнятні трансфекційну ефективність, пікову щільність клітин, ростові властивості, об'ємну продуктивність (VPR) і профіль глікозилування для глікопротеїну, де відібраний субклон з (f) є застосовним для рекомбінантної експресії глікопротеїну. Також представлені способи створення лінії клітин ссавця, застосовної для рекомбінантної експресії глікопротеїну, що передбачають (а) одержання лінії залежних від сироватки крові іморталізованих клітин ссавця; (b) послідовне культивування лінії клітин ссавця в: (1) середовищі для культивування клітин, що має першу концентрацію (1X) сироватки крові тварин, протягом від приблизно 1 дня до приблизно 10 днів (наприклад, приблизно 3 дні); (2) середовищі для культивування клітин, що має від приблизно 0,2X до приблизно 0,6X концентрацію (наприклад, 0,5X) сироватки крові тварин, протягом від приблизно 1 дня до приблизно 10 днів (наприклад, приблизно 3 дні); і (3) середовищі для культивування клітин, що має від 0X до приблизно 0,10X сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів (наприклад, приблизно 8 днів); (c) створення культур одноклітинних субклонів з культури після (b); (d) відбір субклону з (c), що має прийнятні трансфекційну ефективність, клітинний ріст у безсироватковому середовищі для культивування і рекомбінантну експресію білка; (e) створення культур одноклітинних субклонів з відібраного субклону з (d); і (f) відбір субклону з (e), що має прийнятні трансфекційну ефективність, пікову щільність клітин, ростові властивості, об'ємну продуктивність (VPR) і рекомбінантну експресію білка, де відібраний субклон з (f) є застосовним для рекомбінантної експресії глікопротеїну.

У деяких прикладах залежною від сироватки крові лінією іморталізованих клітин ссавця є лінія клітин яєчника китайського хом'ячка. За деякими варіантами здійснення залежна від сироватки крові лінія іморталізованих клітин ссавця ендogenно не експресує дигідрофолатредуктазу. За деякими варіантами здійснення відібраний субклон з (f) зростає у

суспензії. За деякими варіантами здійснення рекомбінантною експресією білка є експресія одного або обох з антитіла й ферменту (наприклад, білка α -галактозидази-А людини). Також представлені клітини ссавця, застосовні для рекомбінантної експресії глікопротеїну, отримані будь-яким із способів, представлених в даному документі.

Також представлені способи отримання рекомбінантного глікопротеїну, що передбачають забезпечення клітини ссавця, застосовної для рекомбінантної експресії глікопротеїну, отриманої будь-яким із способів, представлених в даному документі; введення в клітину вектора експресії, що містить послідовність, яка кодує глікопротеїн; культивування клітини у безсироватковому ростовому середовищі для культивування в умовах, достатніх для продукування глікопротеїну; і збирання глікопротеїну з клітини або з ростового середовища для культивування. У деяких прикладах культивування здійснюють із застосуванням суспензійної культури клітин. За деякими варіантами здійснення культивування здійснюють із застосуванням біореактора. За деякими варіантами здійснення культивування здійснюють із застосуванням безбілкового, безсироваткового середовища з визначеним хімічним складом (наприклад, культивування клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) із застосуванням безбілкового, безсироваткового середовища з визначеним хімічним складом). За деякими варіантами здійснення клітина CHO ендогенно не експресує дигідрофолатредуктазу. За деякими варіантами здійснення рекомбінантним глікопротеїном є фермент (наприклад, білок α -галактозидази-А людини). За деякими варіантами здійснення послідовність, що кодує глікопротеїн, щонайменше на 90% ідентична SEQ ID NO: 1. За деякими варіантами здійснення вектор експресії додатково містить промоторну послідовність, функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності, що кодує глікопротеїн; послідовність, яка кодує пептид білка CD52 людини зі стартовим кодоном TTG, функціонально пов'язаним з 5'-кінцем послідовності, що кодує глікопротеїн; і послідовність, яка кодує полі (А) сайт розпізнавання, функціонально пов'язаний з 3'-кінцем послідовності, що кодує глікопротеїн. За деякими варіантами здійснення промоторна послідовність вибрана з групи, що складається з промотора pS21 хом'яка, промотора β -актину хом'яка й раннього промотора SV40; і послідовністю, що кодує полі (А) сайт розпізнавання, є полі (А) сайт розпізнавання раннього SV40. За деякими варіантами здійснення вектор експресії додатково містить послідовність, що кодує глутамінсинтетазу людини або собаки чи дигідрофолатредуктазу. За деякими варіантами здійснення 5'-кінець послідовності, що кодує глутамінсинтетазу людини або собаки чи дигідрофолатредуктазу, функціонально пов'язаний з раннім промотором SV40, а 3'-кінець послідовності, яка кодує глутамінсинтетазу людини або собаки чи дигідрофолатредуктазу, функціонально пов'язаний з раннім інтроном SV40 і полі(А) сигнальною послідовністю. У деяких прикладах глікопротеїн збирають з клітини. У деяких прикладах глікопротеїн збирають з середовища для культивування клітин. Також представлені рекомбінантні глікопротеїни (наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини), отримані будь-яким із способів, представлених в даному документі. Також представлені фармацевтичні композиції, що містять рекомбінантний глікопротеїн, отриманий будь-яким із способів, представлених в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій. Наприклад, фармацевтична композиція може бути складена для внутрішньовенного, внутрішньоартеріального, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, підшкірного або внутрішньоперитонеального введення. За деякими варіантами здійснення глікопротеїном є рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, і фармацевтична композиція містить концентрацію від приблизно 4 мг/мл до приблизно 6 мг/мл (наприклад, приблизно 5 мг/мл) рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини. За деякими варіантами здійснення фармацевтична композиція є стерильним, ліофілізованим порошком.

Також представлені способи лікування хвороби Фабрі у суб'єкта, що передбачають введення суб'єкту з хворобою Фабрі терапевтично ефективної кількості будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини (rhAGA), представлених в даному документі. За деякими варіантами здійснення введенням є системне введення (наприклад, внутрішньовенне введення). За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять rhAGA у дозі від приблизно 0,5 мг/кг ваги тіла до приблизно 2,0 мг/кг ваги тіла (наприклад, приблизно 1,0 мг/кг ваги тіла). За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять дві або більше доз білка rhAGA. Наприклад, щонайменше дві або більше доз білка rhAGA можуть бути введені з інтервалом приблизно два тижні. Деякі варіанти здійснення додатково передбачають введення суб'єкту одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, вибраних з групи анальгетиків, антикоагулянтів, інгібіторів ацетилхолінестерази, β -блокаторів та інгібіторів гліюзилцерамідсинтази. За деякими варіантами здійснення суб'єктом є суб'єкт-людина. За деякими варіантами здійснення у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі.

Також представлені способи підвищення рівня білка α -галактозидази-А у лізосомі в клітині

ссавця, що передбачають введення у контакт клітини ссавця з ефективною кількістю будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини (rhAGA), представлених в даному документі. За деякими варіантами здійснення клітина знаходиться *in vitro* (наприклад, клітина людини *in vitro*). За деякими варіантами здійснення клітина знаходиться в суб'єкті (наприклад, в людині).

5 За деякими варіантами здійснення у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі. У деяких прикладах введення у контакт здійснюють шляхом системного введення rhAGA суб'єкту. Наприклад, системним введенням може бути внутрішньовенне введення. За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять rhAGA у дозі від приблизно 0,5 мг/кг ваги тіла до приблизно 2,0 мг/кг ваги тіла (наприклад, приблизно 1,0 мг/кг ваги тіла). За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять дві або більше доз білка rhAGA. Наприклад, щонайменше дві з двох або більше доз білка rhAGA можуть бути введені з інтервалом приблизно два тижні.

10 Також представлені способи зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта, що передбачають введення суб'єкту, що цього потребує, терапевтично ефективної кількості будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини (rhAGA), представлених в даному документі. За деякими варіантами здійснення суб'єкт має рівень глоботриаозилцераміду в сироватці крові більш ніж 8 мкг/мл. У деяких прикладах у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі. За деякими варіантами здійснення введенням є системне введення (наприклад, внутрішньовенне введення). За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять rhAGA у дозі від приблизно 0,5 мг/кг ваги тіла до приблизно 2,0 мг/кг ваги тіла (наприклад, приблизно 1,0 мг/кг ваги тіла). За деякими варіантами здійснення суб'єкту можуть бути введені дві або більше доз білка rhAGA. Наприклад, щонайменше дві з двох або більше доз білка rhAGA можуть бути введені з інтервалом приблизно два тижні. Деякі варіанти здійснення додатково передбачають введення суб'єкту одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, вибраних з групи анальгетиків, антикоагулянтів, інгібіторів ацетилхолінестерази, β -блокаторів та інгібіторів глюкозилцерамідсинтази. За деякими

20

25 варіантами здійснення суб'єктом є людина.

Термін "виділений" відноситься до молекули, яку відділяють щонайменше від одного контамінанта (наприклад, білка, нуклеїнової кислоти, ліпиду чи вуглеводу або їх комбінації). В необмежувальних прикладах виділений білок α -галактозидази-А або інший глікопротеїн є чистим щонайменше на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% за вагою.

30

Термін "рідке середовище для культивування" означає рідину, що містить достатні поживні речовини для забезпечення росту або проліферації клітини ссавця *in vitro*. Наприклад, рідке середовище для культивування може містити одне або декілька з амінокислот (наприклад, 20 амінокислот), пурину (наприклад, гіпоксантину), піримідину (наприклад, тимідину), холіну, інозиту, тіаміну, фолієвої кислоти, біотину, кальцію, ніацинамід, піридоксину, рибофлавіну, тимідину, ціанокобаламіну, пірувату, ліпоєвої кислоти, магнію, глюкози, натрію, калію, заліза, міді, цинку й натрію бікарбонату. За деякими варіантами здійснення рідке середовище для культивування може містити сироватку крові ссавця. За деякими варіантами здійснення рідке середовище для культивування не містить сироватку крові або інший екстракт з ссавця (визначене рідке середовище для культивування). За деякими варіантами здійснення рідке середовище для культивування може містити слідові метали, гормон росту ссавця, і/або фактор росту ссавця. Іншим прикладом рідкого середовища для культивування є мінімальне середовище (наприклад, середовище, що включає лише неорганічні солі, джерело вуглецю й воду). Необмежувальні приклади рідкого середовища для культивування описані в даному документі. З рівня техніки відомі й комерційно доступні додаткові приклади рідкого середовища для культивування. Рідке середовище для культивування може мати будь-яку щільність клітин ссавця. Наприклад, як застосовується в даному документі, об'єм рідкого середовища для культивування, видаленого з біореактора, може практично не містити клітин ссавця.

40

45

50 Термін "безсироваткове рідке середовище для культивування" означає рідке середовище для культивування, що не містить сироватку крові ссавця.

Термін "рідке середовище для культивування, що містить сироватку крові" означає рідке середовище для культивування, що включає сироватку крові ссавця.

Термін "середовище для культивування з визначеним хімічним складом" є терміном з рівня техніки й означає рідке середовище для культивування, у якому всі з хімічних компонентів відомі. Наприклад, середовище для культивування з визначеним хімічним складом не містить фетальну бичачу сироватку крові, бичачий сироватковий альбумін або сироватковий альбумін людини, оскільки ці препарати зазвичай містять комплексну суміш альбумінів і ліпідів.

55

Термін "безбілкове рідке середовище для культивування" означає рідке середовище для культивування, що не містить ніякого білка (наприклад, будь-якого виявлюваного білка).

60

Термін "інтегрований процес" означає процес, здійснений із застосуванням структурних елементів, які функціонують спільно з досягненням певного результату (наприклад, створення терапевтичної білкової лікарської речовини (наприклад, що містить рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини) з рідкого середовища для культивування).

Термін "безперервний процес" означає процес, при якому безперервно подається рідина крізь щонайменше частину системи для отримання лікарської речовини (наприклад, лікарської речовини, що містить рекомбінантний білок) з середовища для культивування, що містять рекомбінантний білок (наприклад, будь-який з рекомбінантних білків, описаних в даному документі). Наприклад, рідке середовище для культивування, що містить рекомбінантний терапевтичний білок (наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини), безперервно подають до системи, доки вона функціонує, а терапевтичну білкову лікарську речовину вилучають з системи. Необмежувальні приклади таких систем, які можуть бути застосовані для здійснення безперервного процесу, описані в попередніх заявках на патенти США № 61/856930 і 61/775060.

Термін "хроматографічна система с кількома колонками" або "MCCS" означає систему з двох або більше взаємоз'єднаних або перемикних хроматографічних колонок і/або хроматографічних мембран. Однією типовою хроматографічною системою с кількома колонками є періодична протиструминна хроматографічна система (PCC), що містить дві або більше взаємоз'єднаних або перемикних хроматографічних колонки й/або хроматографічних мембрани. З рівня техніки відомі додаткові приклади хроматографічної системи с кількома колонками. Термін "секретований білок" або "секретований рекомбінантний білок" відомий з рівня техніки й означає білок (наприклад, рекомбінантний білок), який секретується, щонайменше частково, з клітини ссавця у щонайменше міжклітинний простір (наприклад, у рідке середовище для культивування). Фахівцям буде зрозуміло, що "секретований" білок не повинен повністю дісоціювати з клітини, щоб вважатися секретованим білком.

Термін "перфузійне культивування" означає культивування великої кількості клітин (наприклад, клітин ссавця) у першому рідкому середовищі для культивування, де культивування передбачає періодичне або безперервне вилучення першого рідкого середовища для культивування й у той самий час або невдовзі після додавання практично того самого об'єму другого рідкого середовища для культивування до контейнера (наприклад, біореактора). У деяких прикладах передбачається покрокова заміна (наприклад, з підвищенням або зниженням) об'єму першого рідкого середовища для культивування, вилученого й доданого протягом покрокових періодів (наприклад, приблизно 24-годинний період, період від приблизно 1 хвилини до приблизно 24 годин або період більш ніж 24 години) протягом періоду культивування (наприклад, частота повторного подавання середовища для культивування на щоденній основі). Фракція середовища, що вилучається й заміщується кожен день, може варіювати в залежності від конкретних клітин, що підлягають культивуванню, щільності початкового висівання й щільності клітин на конкретний момент часу. "RV" або "реакторний об'єм" означає об'єм середовища для культивування, наявного на початок процесу культивування (наприклад, загальний об'єм середовища для культивування, наявного після висівання). Біореактори, які можуть бути застосовані для здійснення перфузійного культивування відомі з рівня техніки. Фахівцю буде зрозуміло, що біореактор може бути пристосований для застосування при перфузійному культивуванні (наприклад, пристосований як перфузійний біореактор).

Термін "культивування з підживленням" є терміном з рівня техніки й означає культивування великої кількості клітин (наприклад, клітин ссавця) у першому рідкому середовищі для культивування, де культивування клітин, присутніх у контейнері (наприклад, біореакторі) передбачає періодичне або безперервне додавання другого рідкого середовища для культивування до першого рідкого середовища для культивування без суттєвого або значного вилучення першого рідкого середовища для культивування або другого рідкого середовища для культивування з культури клітин. Друге рідке середовище для культивування може бути таким самим, що і перше рідке середовище для культивування. У деяких прикладах культури з підживленням другим рідким середовищем для культивування є концентрована форма першого рідкого середовища для культивування. У деяких прикладах культури з підживленням друге рідке середовище для культивування додають у вигляді сухого порошку. Фахівцю буде зрозуміло, що біореактор може бути пристосований для застосування при культивуванні з підживленням (наприклад, пристосований як біореактор з підживленням).

"Питома продуктивність" або "SPR" є терміном з рівня техніки та, як застосовується в даному документі, відноситься до маси або ферментативної активності рекомбінантного терапевтичного білка, отриманого на клітину ссавця на добу. SPR для рекомбінантного терапевтичного антитіла зазвичай вимірюють як масу/клітина/доба. SPR для рекомбінантного

терапевтичного ферменту зазвичай вимірюють як одиниці/клітина/доба або (одиниці/маса)/клітина/доба.

"Об'ємна продуктивність" або "VPR" є терміном з рівня техніки та, як застосовується в даному документі, відноситься до маси або ферментативної активності рекомбінантного терапевтичного білка, отриманого на об'єм культури (наприклад, на л об'єму біореактора, посудини або пробірки) на добу. VPR для рекомбінантного терапевтичного антитіла зазвичай вимірюють як масу/л/доба. VPR для рекомбінантного терапевтичного ферменту зазвичай вимірюють як одиниці/л/доба або маса/л/доба.

Якщо не визначено інше, усі технічні й наукові терміни, застосовувані в даному документі, мають те саме значення, що і загально зрозумілі пересічному фахівцеві в даній галузі, до якої належить даний винахід. В даному документі описані способи й матеріали для застосування у даному винаході; інші придатні способи й матеріали, відомі з рівня техніки, також можуть бути застосовані. Матеріали, способи й приклади є лише ілюстративними та не призначені для обмежування. Усі публікації, патентні заявки, патенти, переліки послідовностей, значення з баз даних та інші посилання, згадані в даному документі, включені шляхом посилання в усій своїй повноті. У випадку конфлікту контролем буде даний опис, у тому числі визначення.

Подобиці одного або декількох варіантів здійснення даного винаходу викладені у прикладених графічних матеріалах і нижченаведеному описі. Інші ознаки, цілі й переваги даного винаходу стануть зрозумілі з даного опису, графічних матеріалів і з формули винаходу.

Опис графічних матеріалів

На фігурі 1 представлений перелік лізосомних хвороб накопичення й відповідний ферментний дефект для кожної хвороби.

На фігурі 2 представлена послідовність кДНК, що кодує білок-попередник α -галактозидази-А людини та амінокислотна послідовність білка-попередника α -галактозидази-А людини (SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно), і амінокислотна послідовність зрілого білка α -галактозидази-А людини (SEQ ID NO: 3).

На фігурі 3 представлена мапа вектора pGZ629-2GFZ, що включає послідовність кДНК, яка кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини (2GFZ).

На фігурі 4 представлена мапа вектора, який можна застосовувати для експресії рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини.

На фігурі 5 представлена блок-схема, що показує стадії, застосовні для створення батьківської лінії клітин, оптимізованої для експресії рекомбінантного глікопротеїну.

На фігурі 6 представлена хроматограма, що показує елювання Fabrazyme® і Replagal® з колонки вилучення за розміром.

На фігурі 7A представлений профіль час-пролітної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією й десорбцією з рідкої матриці для відношення маси до заряду (MALDI-TOF MS) для Fabrazyme®.

На фігурі 7B представлений профіль мас-спектрометрії MALT-TOF MS для Replagal®.

На фігурі 8 представлений ряд з трьох профілів мас-спектрометрії MALDI-TOF для відношення маси до заряду для Fabrazyme® (верхня частина) і для рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G) (середня й нижня частини).

На фігурі 9 представлене зображення поліакриламідного гелю з додецил-сульфатом натрію для Fabrazyme® і Replagal®.

На фігурі 10 представлений типовий профіль хроматографічного елювання N-зв'язаних олігосахаридів, дериватизованих 2-антраніловою кислотою (AA- мічених), що демонструє структури N-зв'язаного олігосахариду(ів), що відповідають кожному піку. На вставці показані дві структури трьохрозгалуженого трисіалільованого олігосахариду, де одна з двох структур відповідає піку 6 (форма 1), а інша з двох структур відповідає піку 6' (форма 2) у профілі хроматографічного елювання N-зв'язаних олігосахаридів, дериватизованих з 2-AA.

На фігурі 11 представлений профіль хроматографічного елювання AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів з Fabrazyme® (блакитний) і Replagal® (червоний).

На фігурі 12 представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (пік 1), моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (пік 2), моносіалільовані олігосахариди (пік 3), бісіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (пік 4), бісіалільовані олігосахариди (пік 5), трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди (форма 1; пік 6), трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди (форма 2; пік 6'), манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 7), монофосфорильовані олігосахариди (пік 8), тетрасіалільовані олігосахариди (пік 9), моносіалільовані й монофосфорильовані олігосахариди (пік 10) і біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 11)

(зліва на право) у Fabrazyme® (лівий стовпчик у кожній групі з двох стовпчиків) і Replagal® (правий стовпчик у кожній групі з двох стовпчиків).

На фігурі 13 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn108 у Fabrazyme® і Replagal®, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка.

На фігурі 14 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn161 у Fabrazyme® і Replagal®, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка.

На фігурі 15 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn184 у Fabrazyme® і Replagal®, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка.

На фігурі 16 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn108 у Fabrazyme® і FZ2G, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка. На фігурі 17 представлений типовий графік, що демонструє структуру N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх у кожному піку згідно з аналізом LCMS N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn108 у Fabrazyme® і FZ2G.

На фігурі 18 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn161 у Fabrazyme® і FZ2G, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка.

На фігурі 19 представлений графік, що демонструє розподілення N-зв'язаних олігосахаридів, присутніх на амінокислотному залишку Asn184 у Fabrazyme® і FZ2G, як визначено аналізом LCMS кожного ферментативно розщепленого білка.

На фігурі 20 представлений профіль хроматографічного елювання AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів з Fabrazyme® і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G).

На фігурі 21A представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (пік 1), у Fabrazyme® й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 21B представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою моносіалізовані безфукозні олігосахариди, у Fabrazyme® й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 21C представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою моносіалізовані фукозо- вмісні олігосахариди (пік 2), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 22A представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою бісідіалізовані фукозо- вмісні олігосахариди (пік 4), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 22B представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою бісідіалізовані фукозо- вмісні олігосахариди (пік 5), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 22C представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою трьохрозгалужені трисіалізовані олігосахариди (форма 1; пік 6), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 23A представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою трьохрозгалужені трисіалізовані олігосахариди (форма 2; пік 6'), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-

мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 23B представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 7), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 23C представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою монофосфорильовані олігосахариди (пік 8), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 24A представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою тетрасіалільовані олігосахариди (пік 9), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 24B представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою моносіалільовані й монофосфорильовані олігосахариди (пік 10), у Fabrazyme® (FZ) та у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 24C представлений графік, що демонструє відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 11), у Fabrazyme® (FZ) й у рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено хроматографічним аналізом AA-мічених N-зв'язаних олігосахаридів.

На фігурі 25A представлений графік, що демонструє відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка (верхня частина) для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G).

На фігурі 25B представлений графік, що демонструє відношення моль/моль N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA) до білка для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G).

На фігурі 26 представлений графік, що демонструє отримані за допомогою поверхневого плазмонного резонанса (Biacore) незалежного від розчинних катіонів зв'язування манозо-6-фосфатного рецептора для Fabrazyme® (FZ) (червоний) і Replagal® (зелений).

На фігурі 27 представлений графік, що демонструє отримані за допомогою поверхневого плазмонного резонанса (Biacore) незалежного від розчинних катіонів зв'язування манозо-6-фосфатного рецептора для Fabrazyme® (FZ) (червоний) і Replagal® (зелений).

На фігурі 28 представлений графік, що демонструє відносне незалежне від розчинних катіонів зв'язування манозо-6-фосфатного рецептора Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонанса (Biacore).

На фігурі 29 представлений графік, що демонструє відносний відсотковий вміст для Fabrazyme® (FZ) і Replagal®, елюйованих з афінної колонки з манозо-6-фосфатним рецептором, з підвищеними концентраціями манозо-6-фосфату.

На фігурі 30 представлений графік, що демонструє відносний відсотковий вміст для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), елюйованих з афінної колонки з манозо-6-фосфатним рецептором, з підвищеними концентраціями манозо-6-фосфату.

На фігурі 31 представлено профіль піків зображення капілярного ізоелектричного фокусування (icIEF) для Fabrazyme® і Replagal®.

На фігурі 32A представлений графік, що демонструє відсоток для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), що присутній у піках 1-5 icIEF.

На фігурі 32B представлений графік, що демонструє відсоток для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), що присутній у піках 6-11 icIEF.

На фігурі 32C представлений графік, що демонструє відсоток для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), що присутній у піках 12-14 icIEF.

На фігурі 33 представлено графік Km для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), визначений із застосуванням синтетичного субстрату pNP.

На фігурі 34 представлено графік Vmax для Fabrazyme® (FZ) і рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), визначений із застосуванням синтетичного субстрату pNP.

На фігурі 35 представлено профіль елюювання для Fabrazyme® (блакитний) і Replagal® (зелений) з колонки зворотно-фазової високо ефективної рідинної хроматографії (RP-HPLC).

На фігурі 36 представлений графік, що демонструє кількість GL3 у тканині печінки (нг GL3/мг тканини печінки) на моделі миші Fabry через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 0,1 мг/кг Fabrazyme® або через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 0,1 мг/кг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), або на моделі миші Fabry з внутрішньовенним введенням одноразової дози носія. Один зразок вилучали з аналізу, оскільки його вважали випадним згідно критерію Граббса ($p < 0,01$) (група позначена як "а" на графіку).

На фігурі 37 представлений графік, що демонструє кількість GL3 в тканині селезінки (нг GL3/мг тканини селезінки) на моделі миші Fabry через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 0,1 мг/кг Fabrazyme® або через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 0,1 мг/кг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), або на моделі миші Fabry з внутрішньовенним введенням одноразової дози носія.

На фігурі 38 представлений графік, що демонструє кількість GL3 в тканині серця (нг GL3/мг тканини серця) на моделі миші Fabry через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 1,0 мг/кг Fabrazyme® або через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 1,0 мг/кг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), або на моделі миші Fabry з внутрішньовенним введенням одноразової дози носія.

На фігурі 39 представлений графік, що демонструє кількість GL3 на тканині нирки (нг GL3/мг тканини нирки) на моделі миші Fabry через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 1,0 мг/кг Fabrazyme® або через 3 дні або 14 днів після одноразового внутрішньовенного введення 1,0 мг/кг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), або на моделі миші Fabry з внутрішньовенним введенням одноразової дози носія.

На фігурі 40 представлений графік, що демонструє ферментну активність в залежності від часу на моделі миші Fabry після одноразового внутрішньовенного введення 1 мг/кг Fabrazyme® (кружки; 5 мишей на кожну точку часу) або 1 мг/кг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (квадратики; 8 мишей на кожну точку часу).

Докладний опис

В даному документі представлені рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, що має змінений профіль глікозилювання у порівнянні з Fabrazyme®, і композиції, фармацевтичні композиції й набори, що містять щонайменше один з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини. В даному винаході представлені рекомбінантні глікопротеїни й композиції, що містять представлені в даному винаході рекомбінантні глікопротеїни, що мають, наприклад, наступні вигідні якості: меншу варіабельність у глікоформах і більш низький ризик або рівень забруднення (наприклад, більш низький ризик або рівень вірусного забруднення). Представлені в даному винаході рекомбінантні глікопротеїни також можуть мати одну або декілька з наступних необмежувальних переваг: знижене неспецифічне націлювання на печінку (шляхом зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором, експресованим на поверхні гепатоцитів після введення рекомбінантного глікопротеїну суб'єкту, наприклад, суб'єкту-людині), підвищена швидкість ендоцитозу рекомбінантного глікопротеїну в клітині ссавця (наприклад, клітині людини), що експресує білок-рецептор манозо-6-фосфату на своїй поверхні, підвищена афінність до білка-рецептора манозо-6-фосфату, підвищений період напіввиведення сироватки крові й знижена ефективна доза, у будь-якій комбінації, у порівнянні з Fabrazyme®. Також представлені способи створення клітини ссавця, застосовної для рекомбінантної експресії рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, білка α -галактозидази-А людини), і способи отримання рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, білка α -галактозидази-А людини). Також представлені способи лікування хвороби Фабрі, способи зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта й способи підвищення рівня α -галактозидази-А в лізосомі в клітині ссавця (наприклад, в клітині *in vitro* або в клітині у суб'єкта). Також представлені вектори експресії, що включають послідовність, яка кодує білок α -галактозидази-А

людини.

Альфа-галактозидаза-А

α-галактозидаза-А людини (α-D-галактозидгалактогідролаза; α-гал-А; ЕС 3.2.1.22) являє собою лізосомну екзоглікозидазу, що кодується геном на Xq22. Зріла α-галактозидаза-А людини являє собою гомодимер, що складається з двох нековалентно зв'язаних субодиниць з 398 амінокислот (близько 51 kD), кожна з яких містить активний сайт і можливих три N-зв'язаних сайти глікозилування (N139, N192 і N215). Активний сайт білка α-галактозидази-А має два залишки аспарагінової кислоти (D170 і D231), що є важливими для каталітичної активності. Тривимірна кристалічна структура білка α-галактозидази-А була опублікована у 1996 р. (Munier-Lehmann et al., J. Biol. Chem. 271:15166-15174, 1996). Альфа-галактозидаза-А каталізує гідроліз глоботриаозилцераміду (GL-3) та інших нейтральних глікосфінголіпідів з кінцевим α-галактилом, таких як галабіозилцерамід і речовини крові групи В, до цераміддигексодзилу й галактози. Специфічна активність рекомбінантної форми α-галактозидази-А може бути протестована із застосуванням синтетичного субстрату, наприклад, р-нітрофеніл-α-D-галактопіранозиду (pNP).

Глікозилування білка α-галактозидази-А людини забезпечує можливість його націлювання на лізосому у клітинах людини. Короткий опис клітинних шляхів, застосовуваних для глікозилування білка α-галактозидази-А людини та інших глікопротеїнів людини, представлений нижче.

Білок α-галактозидаза-А людини синтезується у ендоплазматичному ретикулумі. Після синтезу кожний мономер білка α-галактозидази-А людини підлягає післятрансляційній модифікації в апараті Гольджі. Як відмічено вище, кожний мономер білка α-галактозидази-А людини має три можливих сайти N-глікозилування (N139, N192 і N215). Існує декілька фізіологічних глікоформ білка α-галактозидази-А людини. Залишок N139 з'єднує комплексні вуглеводи, тоді як залишки N192 і N215 з'єднують олігосахариди, багаті на манозу й через це залучені до націлювання ферменту для поглинання ліпосою. Після синтезу в ендоплазматичному ретикулумі попередники лізосомних ферментів переносяться до апарату Гольджі. Післятрансляційні модифікації та, зокрема, додавання залишків манозо-6-фосфату (M6P), відбувається в цис-Гольджі. Комплекс M6P-фермент зв'язується з рецептором M6P і вивільняється із сітки транс-Гольджі, з якої він транспортується до прелізосомних/ендосомальних компартментів. При потрапленні в ендосомний компартмент кислотний рН спричиняє дисоціацію ферменту від його рецептора. Потім він піддається дефосфорилуванню з утворенням зрілого й функціонального ферменту. Потім рецептор повертається до транс-Гольджі для залучення інших ферментів або переміщується до плазматичної мембрани, де він може збирати ендогенний фермент (Sly et al., J. Cell Biochem. 18:67-85, 1982; Helenius et al., Ann. Rev. Biochem. 32:1-100, 1997).

Біосинтез усіх еукаріотичних N-гліканів починається на цитоплазматичній зовнішній поверхні мембрани ендоплазматичного ретикулуму (ER) з перенесенням GlcNAc-P від UDP-GlcNAc до ліпід-подібного попередника доліхолфосфат (Dol-P) зі створенням доліхолпірофосфат-N-ацетилглюкозаміну (Dol-P-P-GlcNAc). Чотирнадцять цукрів послідовно додаються до Dol-P для отримання глікану Glc3Man9GlcNAc2 перед перенесенням повного глікану до аспарагіну в послідовності Asn-X-Ser/Thr у білку в ER за допомогою білка олігосахарилтрансферази. Потім зв'язаний з білком N-глікан ремоделюється в ER і апараті Гольджі за допомогою складних серій реакцій, каталізованих зв'язаними з мембраною глікозидазами й глікозилтрансферазами. Після ковалентного приєднання 14-цукрових олігоманозогліканів до Asn-X-Ser/Thr серії реакцій застосовуються для вилучення трьох цукрів з Glc3Man9GlcNAc2 в ER. Такі стадії обрізання зберігаються в усіх еукаріот. Обрізання Glc3Man9GlcNAc2 починається з послідовного вилучення глюкозних залишків α-глікозидазами I і II. Обидві глікозидази функціонують у просвіті ER, при цьому α-глікозидаза I діє на кінцевий α1-2Glc, а α-глюкозидаза II потім вилучає два внутрішніх залишки α1-3Glc. Перед виходом з ER багато глікопротеїнів піддаються дії α-манозидази I ER, яка специфічно вилучає кінцевий α1-2Man з центрального плеча Man9GlcNAc2 з утворенням ізомеру Man8GlcNAc2. Більшість глікопротеїнів, що виходять з ER, на шляху до апарату Гольджі мають N-глікани з вісьма або дев'ятьма залишками манози (в залежності від того, чи піддаються вони дії α-манозидази I ER). Для більшості глікопротеїнів додаткові залишки манози вилучаються в цис-компартменти апарату Гольджі, доки не створиться Man5GlcNAc2.

Біосинтез гібридних і комплексних N-гліканів ініціюється в середній частині апарату Гольджі за допомогою дії N-ацетилглюкозамінілтрансферази, яку називають GlcNAcT-1. GlcNAcT-1 додає N-ацетил-глюкозаміновий залишок до C-2 манози α1-3 у ядрі Man5GlcNAc2, яка запускає першу партію N-глікану. Як тільки відбувається ця стадія, більша частина N-гліканів обрізується α-манозидазою II, яка вилучає кінцеві залишки α1-3Man і α1-6Man з GlcNAcMan5GlcNAc2 з утворенням GlcNAcMan3GlcNAc2. Після вилучення двох залишків манози другий N-

ацетилглюкозамін додається до С-2 манози α 1-6 за допомогою GlcNAcT-II з утворенням попередника для усіх дворозгалужених комплексних N-гліканів. Отриманий глікан має два виступи або гілки, що утворилися через додавання кінцевих залишків N-ацетилглюкозаміну. Додаткові гілки можуть бути утворені на С-4 манозі α 1-3 ядра (за допомогою GlcNAcT-IV) і С-6 манозі α 1-6 ядра (за допомогою GlcNAcT-V) з утворенням три- і тетрарозгалужених N-гліканів. Інший фермент, кінцевий GlyNAcT-IX або GlcNAcT-Vb, каталізує ту саму реакцію, що і GlcNAcT-V в С-6 манозі α 1-6 ядра, але на відміну від GlcNAcT-V GlnNAcT-IX/Vb також може переносити N-ацетилглюкозамін до С-6 манози α 1-3 ядра. Інша гілка може бути створена на С-4 манозі α 1-3 ядра за допомогою GlcNAcT-VI.

Комплексні й гібридні N-глікани можуть нести розгалужувальний залишок N-ацетилглюкозаміну, що приєднується до β -манози ядра за допомогою GlcNAcT-III. Бі-, три- й тетрарозгалужені комплексні N-глікани з розгалужувальним N-ацетилглюкозаміном синтезуються, коли GlcNAcT-III діє після α -манозидази II і створення гілок за допомогою GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV і GlcNAcT-V.

Додавання додаткових цукрів, що в основному відбувається у апараті транс-Гольджи, перетворює гібридні й розгалужені N-глікани на велику групу зрілих комплексних N-гліканів. Цукри можуть бути додані до ядра, розгалужувальні залишки N-ацетилглюкозаміну можуть бути подовжені додаванням цукрів, а подовжені гілки можуть бути кеповані або оброблені. Наприклад, продуктом GlcNAcT-II є дворозгалужений N-глікан, який може бути подовжений додаванням фукози, галактози й сілової кислоти зі створенням комплексного N-глікану з двома гілками. Комплексні N-глікани можуть мати, наприклад, багато додаткових цукрів, в тому числі приєднаних до ядра N-глікану, додаткові гілки, гілки, подовжені полі-N-ацетиллактозаміновими одиницями, і різні структури, що кепують. Комплексні типи олігосахаридів синтезуються в апараті Гольджи з манозо-3-вмісних олігосахаридів, наприклад, шляхом додавання залишків N-ацетилглюкозаміну, галактози й сілової кислоти.

Модифікація ядра зазвичай являє собою додавання фукози на α 1-6 зв'язку N-ацетилглюкозаміну, сусіднього з аспарагіном у ядрі глікану. Фукозилтрансферази, залучені у перенесення фукози до цього N-ацетилглюкозаміну ядра, вимагають попередньої дії GlcNAcT-1. Більшість комплексних і гібридних N-гліканів мають подовжені гілки, що утворені шляхом додавання β -зв'язаного галактозного залишку до ініціувального N-ацетилглюкозаміну з утворенням універсального зв'язувального блока Gal β 1-4GlcNAc, який називають N-ацетиллактозаміном 2 типу. Виступи можуть бути додатково подовжені завдяки послідовному додаванню залишків N-ацетилглюкозаміну й галактози з утворенням тандемних повторів LacNAc (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-)n, що називають полі-N-ацетиллактозаміном. В іншому прикладі β -зв'язана галактоза додається до С-3 N-ацетилглюкозаміну з утворенням Gal β 1-3GlcNAc, який називають N-ацетиллактозаміновою послідовністю 1 типу. В деяких білках β -зв'язаний N-ацетилгалактозамін додається до N-ацетилглюкозаміну замість β -зв'язаної галактози з утворенням виступу з подовженням GalNAc β 1-4GlcNAc. Реакції кепування або обробки передбачають додавання до гілок сілової кислоти, фукози, галактози, N-ацетилгалактозаміну й сульфату. Цукри, що кепують, найчастіше є α -зв'язаними та, тому, випинаються з β -зв'язаних стрічкоподібних гілок полі-N-ацетиллактозаміну.

Лізосомні ферменти можуть набувати GlcNAc-1-P при С-6 залишків манози в олігоманозо-N-гліканах у апараті цис-Гольджи. Потім N-ацетил-глюкозамін вилучається в апараті транс-Гольджи за допомогою глікозидази, що тим самим піддає залишки Man-6-P, що розпізнаються рецептором Man-6-P і спрямовуються для підкислення, дії прелізосомного компартмента.

Гібридні типи олігосахаридів синтезуються в апараті Гольджи із структур манози-3 і манози-5 ядра шляхом додавання, наприклад, залишків N-ацетилглюкозаміну, галактози й сілової кислоти. Гібридні N-глікани утворюються, якщо GlcNAcMan₅GlcNAc₂ глікан не піддається дії α -манозидази II, в результаті чого периферичні залишки α 1-3Man і α 1-6Man залишаються інтактними й немодифікованими в зрілому глікопротеїні. Незавершена дія α -манозидази II може дати в результаті гібриди GlcNAcMan₄GlcNAc₂. Інша манозидаза апарата Гольджи, α -манозидаза IIX, також діє на GlnNAcMan₅GlcNAc₂, створений за допомогою GlcNAcT-1.

Докладний огляд шляхів біосинтезу й ферментів, застосованих для створення N-зв'язаних гліканів (наприклад, високо манозних типів олігосахаридів) описані в Stanley et al., "N-Glycans" in Essentials of Glycobiology, Ed. Varki, Cummings, and Eskho, Cold Spring Harbor Press, 2009. Як зазначено вище, післятрансляційне глікозилювання рекомбінантної α -галактозидази-A людини є важливим для належної спрямованої міграції білка. Наприклад, заміна серинового залишку в амінокислотному положенні 215 призводить до порушення спрямованої міграції ферменту до ліпосоми (Munier-Lehmann et al., J. Biol. Chem. 271:15166-15174, 1996; Wildt et al., Nat. Rev. Microbiol. 3:119-128, 2005). Дослідження різних глікоформ білка α -галактозидази-A людини,

експресованого в клітині CHO, описується в Matsuura et al., *Glycobiology* 8:329-339, 1998.

Типовий попередник і зрілі послідовності білка α -галактозидази-А людини представлені на фігурі 2, відповідно (SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно). Рекомбінантний білок α -галактозидази людини, описаний в даному документі, може містити послідовність, яка щонайменше на 95% ідентична (наприклад, щонайменше на 96%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентична) SEQ ID NO: 1 або 2. Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини можуть мати (наприклад, складатися з) послідовність, яка щонайменше на 95% ідентична (наприклад, щонайменше на 96%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентична) SEQ ID NO: 1 або 2. В інших прикладах рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини може містити послідовність SEQ ID NO: 2 з 1-30 амінокислотами (наприклад, 1-25 амінокислотами, 1-20 амінокислотами, 1-15 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-5 амінокислотами, 1-3 амінокислотами, 1 або 2 амінокислотами, 20-25 амінокислотами, 15-25 амінокислотами, 10-25 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-8 амінокислотами й 5-15 амінокислотами), видаленими з N-кінця, і/або 1-30 амінокислотами, видаленими з C-кінця (наприклад, 1-25 амінокислотами, 1-20 амінокислотами, 1-15 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-5 амінокислотами, 1-3 амінокислотами, 1 або 2 амінокислотами, 20-25 амінокислотами, 15-25 амінокислотами, 10-25 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-8 амінокислотами і 5-15 амінокислотами).

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини може бути ковалентно зв'язаний з гетерологічною амінокислотою послідовність або міткою. Необмежувальні приклади гетерологічної амінокислотної послідовності, яка може бути зв'язана з рекомбінантним білком α -галактозидази людини, передбачають полі-His мітку, хітин-зв'язувальний білок, мальтоза-зв'язувальний білок, глутатіон-S-трансферазу й стрептавідин. Будь-який тип мітки може бути ковалентно зв'язаний з білком α -галактозидази-А людини (наприклад, флуоресцентна група, радіонуклеотид і флуоресцентний білок). Додаткові приклади молекул, що можуть бути ковалентно зв'язані з білком α -галактозидази-А людини, передбачають полімер, наприклад, поліетиленгліколь, полівініл, поліестер, полілактид, полігліколід, полікапролактон та їх сополімери.

Типовий попередник і зрілі послідовності білка α -галактозидази-А людини представлені на фігурі 2, відповідно (SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно). Рекомбінантний білок α -галактозидази людини, описаний в даному документі, може містити послідовність, яка щонайменше на 95% ідентична (наприклад, щонайменше на 96%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентична) SEQ ID NO: 1 або 2. Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини можуть мати (наприклад, складатися з) послідовність, яка щонайменше на 95% ідентична (наприклад, щонайменше на 96%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентична) SEQ ID NO: 1 або 2. В інших прикладах рекомбінантний білок амінокислотами (наприклад, 1-25 амінокислотами, 1-20 амінокислотами, 1-15 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-5 амінокислотами, 1-3 амінокислотами, 1 або 2 амінокислотами, 20-25 амінокислотами, 15-25 амінокислотами, 10-25 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-8 амінокислотами й 5-15 амінокислотами), видаленими з N-кінця, і/або 1-30 амінокислотами, видаленими з C-кінця (наприклад, 1-25 амінокислотами, 1-20 амінокислотами, 1-15 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-5 амінокислотами, 1-3 амінокислотами, 1 або 2 амінокислотами, 20-25 амінокислотами, 15-25 амінокислотами, 10-25 амінокислотами, 1-10 амінокислотами, 1-8 амінокислотами і 5-15 амінокислотами).

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини може бути ковалентно зв'язаний з гетерологічною амінокислотою послідовність або міткою. Необмежувальні приклади гетерологічної амінокислотної послідовності, яка може бути зв'язана з рекомбінантним білком α -галактозидази людини, передбачають полі-His мітку, хітин-зв'язувальний білок, мальтоза-зв'язувальний білок, глутатіон-S-трансферазу й стрептавідин. Будь-який тип мітки може бути ковалентно зв'язаний з білком α -галактозидази-А людини (наприклад, флуоресцентна група, радіонуклеотид і флуоресцентний білок). Додаткові приклади молекул, що можуть бути ковалентно зв'язані з білком α -галактозидази-А людини, передбачають полімер, наприклад, поліетиленгліколь, полівініл, поліестер, полілактид, полігліколід, полікапролактон та їх сополімери.

Типова нуклеїнова кислота (наприклад, кДНК), що кодує білок α -галактозидази-А людини, показана на фігурі 2 (SEQ ID NO: 1).

У деяких прикладах будь-яка з нуклеїнових кислот (наприклад, кДНК), описаних в даному документі, можуть бути ковалентно зв'язані з одним або декількома з флуоресцентної мітки й гасильника. В інших прикладах будь-яка з нуклеїнових кислот (наприклад, кДНК) може містити або додатково містити щонайменше один нуклеотид, що включає радіоіотоп (наприклад, P^{32} , P^{33} і/або S^{35}).

Змінені глікоформи білка α -галактозидази-А

Даний опис представляє рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини (FZ2G), що мають змінене (наприклад, поліпшене) глікозилювання, у порівнянні з Fabrazyme®. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, мають, наприклад, підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, (у порівнянні з Fabrazyme®) що забезпечує підвищене зв'язування з манозо-6-фосфатним рецептором, який, у свою чергу, може підвищити швидкість ендцитозу рекомбінантного білка клітиною ссавця (наприклад, клітиною людини), що експресує білок-рецептор манозо-6-фосфату на своїй поверхні (у порівнянні з Fabrazyme®). Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, також можуть мати одне або обидва зі зниженого відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, і підвищеного відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою тетрасіалільовані олігосахариди, у порівнянні з Fabrazyme®, що може давати зниження неспецифічного націлювання рекомбінантного білка на печінку (шляхом зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором, експресованим на поверхні гепатоцитів, після введення рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини суб'єкту, наприклад, суб'єкту-людині) і підвищений період напіввиведення з сироватки крові, відповідно, у порівнянні з Fabrazyme®.

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі, також, наприклад, демонструє меншу варіабельність в своїй композиції (наприклад, меншу варіабельність у глікоформах) та/або є більш безпечним продуктом (наприклад, знижений ризик або рівень забруднення одним або декількома з бактеріофагів, бактерій, мікобактерій і вірусів (наприклад, ентеровірусів (наприклад, ентеровірусів людини або тварини), ріновірусів (наприклад, ріновірусів людини або тварини), людських або тваринних пікобірнавірусів, кобувірусів, інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, вірусу діареї великої рогатої худоби, реовірусу-3 великої рогатої худоби, тварини), спумаірусів великої рогатої худоби, ендегенного ретровірусу свині, вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби, вірусів гепатиту, Vesivirus (наприклад, Vesivirus 2117), норовірусів (наприклад, норовірусів людини або тварини), астровірусів (наприклад, астровірусів людини або тварини), вірусу парагрипу або метапневмовірусу людини або тварини, анелловірусів, коронавірусів, флебовірусів, вірусу Шмалленберга великої рогатої худоби, каліцивірусу, цикловірусів, цирковірусів (наприклад, цирковірусу свиней або великої рогатої худоби), козавірусів, вірусу Коксаки, кубавірусу, пестівірусу, вірусів полііоми (наприклад, вірусу полііоми великої рогатої худоби), папілома вірусу великої рогатої худоби, нового вірусу папіломи гризунів 2 типу SV40, парвовірусів (наприклад, парвовірусу свиней, гризунів, людей або великої рогатої худоби), кардіовірусів (наприклад, EMCV), параміксовірусів, вірусу везикулярного стоматиту, гіровірусів, козавірусу, вірусу долини Сенека, коронавірусу, інфекційної анемії коней, аденовірусу людини, каліцивірусу кішок, аденовірусу 2 типу, аденовірусу 3 типу великої рогатої худоби, вірусу псевдоскажу, вірусної діареї великої рогатої худоби, парагрипу 3 типу, інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, вірусу блютанга, вірусу лейкомії кішок, дрібного вірусу мишей, парвовірусу великої рогатої худоби, вірусу долини Кеш, реовірусу (наприклад, реовірусу людини або тварини), аденовірусу коней, вірусу SV-40, вірусу енцефаломіокардиту, PRRSV свиней, вірусу герпесу 4 великої рогатої худоби або ящуру)).

Раніше було показано, що Fabrazyme® має значно відмінний патерн глікозилювання у порівнянні з Replagal® (Lee et al., Glycobiology 13:305-313, 2003). Помітні відмінності в патерні глікозилювання Fabrazyme® і Replagal®, як вважають, обумовлені, зокрема, різними лініями клітин, які застосовують для отримання цих білків (наприклад, Fabrazyme® продукується лінією клітин CHO, а Replagal® продукується лінією клітин людини).

Fabrazyme® є рекомбінантною формою білка α -галактозидази-А людини, який отримує й продає Genzyme. Fabrazyme® і способи створення Fabrazyme® описані, наприклад, в патенті США № 5356804. Replagal® є рекомбінантною формою білка α -галактозидази-А людини, який отримує й продає Shire. Replagal® і способи створення Replagal® описані, наприклад, в патентах США №№ 6083725, 6458574, 6395884 і 7133354.

Рекомбінантні білки α -галактозидази людини, представлені в даному документі (FZ2G), мають дві або більше (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12) будь-яких із структурних ознак (наприклад, у будь-якій комбінації) (i) - (xii), приведених нижче. Будь-які з діапазонів значень, приведених нижче, для кожного з одного або декількох параметрів з (i) до (xii) можуть бути присутні у рекомбінантному білку α -галактозидази-А людини, представленому в даному документі. Крім того, будь-який з рекомбінантних білків α -галактозидази людини, представлених в даному документі, можуть мати одну або декілька (наприклад, одну, дві або три) з типових функціональних властивостей, описаних в даному розділі. Будь-яка комбінація фізичних

характеристик і/або функціональних властивостей рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, можуть бути об'єднані будь-яким способом. Нижче описані типові комбінації структурних ознак рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, представлених в даному документі.

5 Крім того, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати меншу варіабельність в структурі (наприклад, меншу варіабельність у глікоформах) і/або знижений ризик або рівень забруднення (наприклад, знижений ризик або рівень забруднення).

10 Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, можуть не мати детектований рівень або не мати білок, ліпід, вуглевод, нуклеїнову кислоту та контамінант (наприклад, будь-який з контамінантів, описаних у даному документі), присутні у продукті тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або продукт крові тварин). Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, 15 вибрані з групи безбілкового, безсироваткового та середовища з визначеним хімічним складом. Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки безбілкове й/або середовище з визначеним хімічним складом. Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA, продукований у культурі клітин, у якій використовували тільки культуральні середовища, вибрані з групи, що складається з безбілкового, безсироваткового та середовища з визначеним хімічним складом, та який виділяють із застосуванням інтегрованого та безперервного процесу (наприклад, будь-який з інтегрованого та безперервного процесів, описаних у даному документі або у WO 14/137903). Будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі, може являти собою білок rhAGA з покращеним профілем безпеки 20 (наприклад, знижений ризик забруднення (наприклад, будь-який з ілюстративних контамінантів, описаних у даному документі або відомих з рівня техніки)) порівняно з білком rhAGA, представленим у даному документі, який продукується за допомогою способу, який включає застосування середовища для культивування, що містить продукт тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або фактор або білок крові тварин).

30 Біофізичні властивості

I. N-зв'язані моносіалільовані олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, описані в даному документі, можуть мати знижений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, у порівнянні з Fabrazyme®. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, описані в даному документі, можуть мати приблизно такий самий або 35 трохи знижений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозовмісні олігосахариди, у порівнянні з Fabrazyme®. Ця ознака є перевагою, оскільки моносіалільовані олігосахариди можуть містити відкриті галактозні залишки, які зв'язуються з асіалоглікопротеїновим рецептором, експресованим на гепатоцитах в печінці. Печінка не є цільовою тканиною для рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, і, таким чином, зниження кількості моносіалільованих олігосахаридів, як вважають, знижує непродуктивне націлювання цього ферменту в організмі людини.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 3 у профілях міченого антраніловою кислотою 45 N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 1,7% до приблизно 3,2%. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, (FZ2G) можуть мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 3 у профілях міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 1,6% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 1,5%, від 50 приблизно 0,1% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 0,4%, від приблизно 0,2% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,2% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,2% до приблизно 1,2%, від 55 приблизно 0,2% до приблизно 1,0%, від приблизно 0,2% до приблизно 0,9%, від приблизно 0,2% до приблизно 0,8%, від приблизно 0,2% до приблизно 0,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 0,3% до приблизно 1,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 0,3% до приблизно

0,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 0,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 0,7%, від приблизно 0,4% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,4% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,4% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,4% до приблизно 1,1%, від приблизно 0,4% до приблизно 1,0%, від приблизно 0,4% до приблизно 0,9%, від приблизно 0,4% до приблизно 0,8%, від приблизно 0,4% до приблизно 0,7%, від приблизно 0,5% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,5% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,5% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,5% до приблизно 1,1%, від приблизно 0,5% до приблизно 1,0%, від приблизно 0,5% до приблизно 0,9% або від приблизно 0,6% до приблизно 1,2%).

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 2 у профілях міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 2,0% до приблизно 5,7%. Рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини, представлені в даному документі (FZ2G), можуть мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 2 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до 3,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,0, від приблизно 0,3% до приблизно 1,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,3% або від приблизно 0,3% до приблизно 1,2%).

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою моносіалільовані олігосахариди або моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

II. N-зв'язані біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини, представлені в даному документі, можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Підвищений рівень біс-манозо-6-фосфат-вмісних олігосахаридів дає в результаті підвищене націлювання на клітини, які експресують манозо-6-фосфатний рецептор на своїй плазматичній мембрані. Зв'язування з манозо-6-фосфатним рецептором запускає ендоцитоз ферменту в клітині й переносить фермент до клітинної лізосоми.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 у профілях міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 4,0% до приблизно 7,0%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 7,5% (наприклад, більш ніж приблизно 7,6%, більш ніж приблизно 7,7%, більш ніж приблизно 7,8%, більш ніж приблизно 7,9%, більш ніж приблизно 8,0%, більш ніж приблизно 8,1%, більш ніж приблизно 8,2%, більш ніж приблизно 8,2%, більш ніж приблизно 8,3%, більш ніж приблизно 8,4%, більш ніж приблизно 8,5%, більш ніж приблизно 8,6%, більш ніж приблизно 8,7%, більш ніж приблизно 8,8%, більш ніж приблизно 8,9%, більш ніж приблизно 8,9%, більш ніж приблизно 9,0%, більш ніж приблизно 9,1%, більш ніж приблизно 9,2%, більш ніж приблизно 9,3%, більш ніж приблизно 9,4%, більш ніж приблизно 9,5%, більш ніж приблизно 9,6%, більш ніж приблизно 9,7%, більш ніж приблизно 9,8%, більш ніж приблизно 9,9%, більш ніж приблизно 10,0%, більш ніж приблизно 10,1%, більш ніж приблизно 10,2%, більш ніж приблизно 10,3%, більш ніж приблизно 10,4%, більш ніж приблизно 10,5%, більш ніж приблизно 10,6%, більш ніж приблизно 10,7%,

більш ніж приблизно 10,8%, більш ніж приблизно 10,9% або більш ніж приблизно 11%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 7,0% до приблизно 13%, від приблизно 8,0% до приблизно 12,0% або від приблизно 9,0% до приблизно 11,0%.

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

III. N-зв'язані бісгаліфільовані та N-зв'язані бісгаліфільовані фукозо-вмісні олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, можуть мати приблизно такий самий або підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані фукозо- вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Представлені рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані олігосахариди (наприклад, пік 5 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Вважають, що підвищений рівень бісгаліфільованих фукозо-вмісних олігосахаридів збільшує період напіввиведення білка *in vivo* і/або *in vitro* (наприклад, в сироватці крові у суб'єкта або в фармацевтичній композиції).

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 11,0% до приблизно 14,2%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 13,0% (наприклад, більш ніж приблизно 13,1%, більш ніж приблизно 13,2%, більш ніж приблизно 13,3%, більш ніж приблизно 13,4%, більш ніж приблизно 13,5%, більш ніж приблизно 13,6%, більш ніж приблизно 13,7%, більш ніж приблизно 13,8%, більш ніж приблизно 13,9%, більш ніж приблизно 14,0%, більш ніж приблизно 14,1%, більш ніж приблизно 14,2%, більш ніж приблизно 14,3%, більш ніж приблизно 14,4%, більш ніж приблизно 14,5%, більш ніж приблизно 14,6%, більш ніж приблизно 14,7%, більш ніж приблизно 14,8%, більш ніж приблизно 14,9% або більш ніж 15,0%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 13,0% до приблизно 15,0%, від приблизно 13,5% до приблизно 15,5%, від приблизно 14,0% до приблизно 16,0% або від приблизно 14,5% до приблизно 16,5%.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані олігосахариди (наприклад, пік 5 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 5,6% до приблизно 7,1%. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, можуть мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліфільовані олігосахариди (наприклад, пік 5 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 5,3% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 5,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,8%, приблизно 0,1% до приблизно 3,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 5,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 5,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,3%

до приблизно 4,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 4,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,6% або від приблизно 0,3% до приблизно 2,5%).

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісiалільовані та бісiалільовані фукозо-вмісні олігосахариди, описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

IV. N-зв'язані трисіалільовані олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою трьохрозгалужені, трисіалільовані олігосахариди форми 2 (тобто пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, можуть мати знижений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 1 (наприклад, пік 6 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Вставка на фігурі 10 показує дві структури трьохрозгалуженого трисіалільованого олігосахариду, де одна з двох структур відповідає піку 6 (форма 1), а інша з двох структур відповідає піку 6' (форма 2) на профілі хроматографічного елюювання N-зв'язаних олігосахаридів, дериватизованих з 2-AA. Вважають, що підвищений рівень трисіалільованих фукозо-вмісних олігосахаридів збільшує період напіввиведення білка *in vivo* і/або *in vitro* (наприклад, в сироватці крові у суб'єкта або в фармацевтичній композиції).

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 2 (наприклад, пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,5% до приблизно 1,2%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужений трисіалільовані олігосахариди форми 2 (наприклад, пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж 2,0% (наприклад, більш ніж 2,1%, більш ніж 2,2%, більш ніж 2,3%, більш ніж 2,4%, більш ніж 2,5%, більш ніж 2,6%, більш ніж 2,7%, більш ніж 2,8%, більш ніж 2,9%, більш ніж 3,0%, більш ніж 3,1%, більш ніж 3,2%, більш ніж 3,3%, більш ніж 3,4%, більш ніж 3,5%, більш ніж 3,6%, більш ніж 3,7%, більш ніж 3,8%, більш ніж 3,9%, більш ніж 4,0%, більш ніж 4,1%, більш ніж 4,2%, більш ніж 4,3%, більш ніж 4,4%, більш ніж 4,5%, більш ніж 4,6%, більш ніж 4,7%, більш ніж 4,8%, більш ніж 4,9%, більш ніж 5,0%, більш ніж 5,1%, більш ніж 5,2%, більш ніж 5,3%, більш ніж 5,4%, більш ніж 5,5%, більш ніж 5,6%, більш ніж 5,7%, більш ніж 5,8%, більш ніж 5,9%, більш ніж 6,0%, більш ніж 6,1%, більш ніж 6,2%, більш ніж 6,3%, більш ніж 6,4%, більш ніж 6,5%, більш ніж 6,7%, більш ніж 6,8%, більш ніж 6,9%, більш ніж 7,0% або більш ніж 7,1%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 2 (наприклад, пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 5,0% до приблизно 9,0%, від приблизно 5,5% до приблизно 8,5%, від приблизно 6,0% до приблизно 8,0% або від приблизно 6,5% до приблизно 7,5%.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 1 (наприклад, пік 6 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 9,5% до приблизно 13%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі, може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 1 (наприклад, пік 6 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 0,1% до приблизно 9,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 8,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,7%, від приблизно 0,1%

до приблизно 8,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,1% або від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%).

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалізовані олігосахариди, описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

V. Відношення моль/моль сіалової кислоти/білка

Рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини, представлені в даному документі, можуть мати відношення моль/моль сіалової кислоти до білка, яке є приблизно таке саме або більш ніж в Fabrazyme®. Вважають, що підвищене число молекул сіалової кислоти, присутніх в олігосахаридних, підвищує період напіввиведення білка *in vitro* і/або *in vivo* (наприклад, у фармацевтичній композиції і в сироватці крові ссавця).

Fabrazyme® має відношення моль/моль сіалової кислоти до білка від приблизно 2,6 до приблизно 3,3. Fabrazyme® також має відношення моль/моль сіалової кислоти до манозо-6-фосфату, яке більше ніж 1,5. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відношення моль/моль сіалової кислоти до білка, яке більше ніж 3,0 (наприклад, більше ніж 3,1, більше ніж 3,2, більше ніж 3,3, більше ніж 3,4, більше ніж 3,5, більше ніж 3,6, більше ніж 3,7, більше ніж 3,8, більше ніж 3,9, більше ніж 4,0, більше ніж 4,1, більше ніж 4,2, більше ніж 4,3, більше ніж 4,4, більше ніж 4,5, більше ніж 4,6, більше ніж 4,7, більше ніж 4,8, більше ніж 4,9 або більше ніж 5,0).

Типові способи визначення відношення моль/моль сіалової кислоти до білка описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

VI. N-зв'язані нейтрально заряджені олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини, представлені в даному документі, можуть мати знижений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою N-зв'язані нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 4,0% до приблизно 7,1%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі, може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 0,1% до приблизно 3,9% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 3,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,1%, від приблизно 0,1%

до приблизно 3,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 1,1%, від приблизно 0,1% і 1,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,1%, від приблизно 0,3% до приблизно 2,0%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,9%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,8%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,7%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,6%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,5%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,4%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,3%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,2%, від приблизно 0,3% до приблизно 1,1% або від приблизно 0,3% до приблизно 1,0%).

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

VII. N-зв'язані манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди

Представлені рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини можуть мати приблизно такий самий або трохи знижений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди, у порівнянні з Fabrazyme®.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою N-зв'язані манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 5,5% до приблизно 10,0%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 0,1% до приблизно 7,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 6,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,1%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,9%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,8%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,7%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,6%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,4%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,3%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,2%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,1% або від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 5,0% до приблизно 7,0%.

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

VIII. N-зв'язані монофосфорильовані олігосахариди

Представлені рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою монофосфорильовані олігосахариди, у порівнянні з Fabrazyme®.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою

N-зв'язані монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 10,9% до приблизно 14,7%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що

5 являють собою монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання мічених антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 14,8% (наприклад, більш ніж приблизно 14,9%, більш ніж 15,0%, більш ніж приблизно 15,1%, більш ніж приблизно 15,2%, більш ніж приблизно 15,3%, більш ніж приблизно 15,4%, більш ніж приблизно 15,5%, більш ніж приблизно 15,6%, більш ніж приблизно 15,7%, більш ніж приблизно 15,8%,

10 більш ніж приблизно 15,9%, більш ніж приблизно 16,0%, більш ніж приблизно 16,1%, більш ніж приблизно 16,2%, більш ніж приблизно 16,3%, більш ніж приблизно 16,4%, більш ніж приблизно 16,5%, більш ніж приблизно 16,6%, більш ніж приблизно 16,7%, більш ніж приблизно 16,8%, більш ніж приблизно 16,9%, більш ніж приблизно 17,0%, більш ніж приблизно 17,1%, більш ніж приблизно 17,2%, більш ніж приблизно 17,3%, більш ніж приблизно 17,4%, більш ніж приблизно 17,5%, більш ніж приблизно 17,6%, більш ніж приблизно 17,7%, більш ніж приблизно 17,8%,

15 більш ніж приблизно 17,9%, більш ніж приблизно 18,0%, більш ніж приблизно 18,1%, більш ніж приблизно 18,2%, більш ніж приблизно 18,3%, більш ніж приблизно 18,4%, більш ніж приблизно 18,5%, більш ніж приблизно 18,6%, більш ніж приблизно 18,7%, більш ніж приблизно 18,8%, більш ніж приблизно 18,9%, більш ніж приблизно 19,0%, більш ніж приблизно 19,1%, більш ніж приблизно 19,2%, більш ніж приблизно 19,3%, більш ніж приблизно 19,4%, більш ніж приблизно 19,5%, більш ніж приблизно 19,6%, більш ніж приблизно 19,7%, більш ніж приблизно 19,8%, більш ніж приблизно 19,9%, більш ніж приблизно 20,0%, більш ніж приблизно 20,1%, більш ніж приблизно 20,2%, більш ніж приблизно 20,3%, більш ніж приблизно 20,4%, більш ніж приблизно 20,5%, більш ніж приблизно 20,6%, більш ніж приблизно 20,7%, більш ніж приблизно 20,8%,

20 більш ніж приблизно 20,9%, більш ніж приблизно 21,0%, більш ніж приблизно 21,1%, більш ніж приблизно 21,2%, більш ніж приблизно 21,3%, більш ніж приблизно 21,4%, більш ніж приблизно 21,5%, більш ніж приблизно 21,6%, більш ніж приблизно 21,7%, більш ніж приблизно 21,8%, більш ніж приблизно 21,9%, більш ніж приблизно 22,0%, більш ніж приблизно 22,1%, більш ніж приблизно 22,2%, більш ніж приблизно 22,3%, більш ніж приблизно 22,4%, більш ніж приблизно 22,5%, більш ніж приблизно 22,6%, більш ніж приблизно 22,7%, більш ніж приблизно 22,8%, більш ніж приблизно 22,9% або більш ніж приблизно 23,0%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 15,5% до приблизно 17,5%, від приблизно 16,0% до приблизно 18,0% або від приблизно 16,5% до приблизно 18,5%.

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), описані в прикладах. Додаткові способи

40 відомі з рівня техніки.

IX. N-зв'язані тетрасіалильовані олігосахариди

Рекомбінантні білки α -галактозидази-A людини, представлені в даному документі, можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою тетрасіалильовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою

45 кислотою N-зв'язаного олігосахариду), у порівнянні з Fabrazyme®. Вважають, що підвищений рівень тетрасіалильованих олігосахаридів збільшує період напіввиведення білка *in vivo* і/або *in vitro* (наприклад, в сироватці крові у суб'єкта або в фармацевтичній композиції).

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалильовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою

50 кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 2,3% до приблизно 4,8%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалильовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 4,9% (наприклад,

55 більш ніж приблизно 5,0%, більш ніж приблизно 5,1%, більш ніж приблизно 5,2%, більш ніж приблизно 5,3%, більш ніж приблизно 5,4%, більш ніж приблизно 5,5%, більш ніж приблизно 5,6%, більш ніж приблизно 5,7%, більш ніж приблизно 5,8%, більш ніж приблизно 5,9%, більш ніж приблизно 6,0%, більш ніж приблизно 6,1%, більш ніж приблизно 6,2%, більш ніж приблизно 6,3%, більш ніж приблизно 6,4%, більш ніж приблизно 6,5%, більш ніж приблизно 6,6%, більш ніж приблизно 6,7%, більш ніж приблизно 6,8%, більш ніж приблизно 6,9%, більш ніж приблизно

60

7,0%, більш ніж приблизно 7,1%, більш ніж приблизно 7,2%, більш ніж приблизно 7,3%, більш ніж приблизно 7,4%, більш ніж приблизно 7,5%, більш ніж приблизно 7,6%, більш ніж приблизно 7,7%, більш ніж приблизно 7,8%, більш ніж приблизно 7,9% або більш ніж приблизно 8,0%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалізовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 6,0% до приблизно 8,0%, від приблизно 6,5% до приблизно 8,5%, від приблизно 6,0% до приблизно 9,0% або від приблизно 7,0% до приблизно 9,0%.

Типові способи здійснення та визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою тетрасіалізовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

X. N-зв'язані гібридні структури, що є моносіалізованими та монофосфорильованими

Представлені рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини можуть мати підвищений відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані, монофосфорильовані, гібридні структури, у порівнянні з Fabrazyme®.

Fabrazyme® має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані монофосфорильовані гібридні олігосахариди (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 6,0% до приблизно 8,1%. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі, може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних гібридних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані монофосфорильовані гібридні олігосахариди (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 8,2% (наприклад, більш ніж приблизно 8,3%, більш ніж приблизно 8,4%, більш ніж приблизно 8,5%, більш ніж приблизно 8,6%, більш ніж приблизно 8,7%, більш ніж приблизно 8,8%, більш ніж приблизно 8,9%, більш ніж приблизно 9,0%, більш ніж приблизно 9,1%, більш ніж приблизно 9,2%, більш ніж приблизно 9,3%, більш ніж приблизно 9,4%, більш ніж приблизно 9,5%, більш ніж приблизно 9,6%, більш ніж приблизно 9,7%, більш ніж приблизно 9,8%, більш ніж приблизно 9,9%, більш ніж приблизно 10,0%, більш ніж приблизно 10,1%, більш ніж приблизно 10,2%, більш ніж приблизно 10,3%, більш ніж приблизно 10,4%, більш ніж приблизно 10,5%, більш ніж приблизно 10,6%, більш ніж приблизно 10,7%, більш ніж приблизно 10,8%, більш ніж приблизно 10,9%, більш ніж приблизно 11,0%, більш ніж приблизно 11,1%, більш ніж приблизно 11,2%, більш ніж приблизно 11,3%, більш ніж приблизно 11,4% або більш ніж приблизно 11,5%). Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі, може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних гібридних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані монофосфорильовані гібридні олігосахариди (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 8,5% до 10,5%, від приблизно 9,0% до приблизно 11,0% або від приблизно 8,5% до приблизно 9,5%.

Типові способи визначення відсоткового вмісту загальних N-зв'язаних олігосахаридів, які являють собою моносіалізовані та монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), описані в прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

XI. Ізоелектрична точка

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, також мають зміщену ізоелектричну точку у порівнянні з Fabrazyme® при аналізі за допомогою зображеного капілярного ізоелектричного фокусування (icIEF) (див. приклад 3 і таблицю 3).

Типові способи визначення ізоелектричної точки поліпептиду описані в прикладах. Додаткові способи визначення ізоелектричної точки поліпептиду (наприклад, у гелях для ізоелектричного фокусування) відомі з рівня техніки.

XII. Відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в даному документі, можуть мати відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка, яке є приблизно таке саме або більш ніж в Fabrazyme®. Вважають, що підвищене відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка підвищує клітинне відновлення білка клітинами, що експресують манозо-6-фосфатний рецептор у плазматичній мембрані.

Fabrazyme® має відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка від приблизно 1,7 до приблизно 3,1. Наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), може мати відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка, яке в

[illegible]

Типові способи визначення відношення моль/моль манозо-6-фосфату до білка описані в

прикладах. Додаткові способи відомі з рівня техніки.

Функціональні властивості

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, представлені в данному документі, можуть мати одну або декілька (наприклад, одну, дві або три) з наступних функціональних ознак: підвищений ендоцитоз (наприклад, підвищена швидкість ендоцитозу) клітиною ссавця, що експресує манозо-6-фосфатний рецептор, знижене зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором і підвищена афінність до манозо-6-фосфатного рецептора, кожна у порівнянні з Fabrazyme®.

Способи визначення ендоцитозу (наприклад, швидкість ендоцитозу) рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини в клітині ссавця, що експресує манозо-6-фосфат, відомі з рівня техніки (наприклад, з Osborne et al., Curr. Protoc. Cell Biol., Chapter 11, Unit 11.18, 2005). Необмежувальні приклади клітин ссавця, що експресують манозо-6-фосфатний рецептор, передбачають фібробласти й епітеліальні клітини. Як відомо з рівня техніки, ендоцитоз рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, може бути виявлений за зниженням рівнів білка в середовищі для культивування тканин (або в сироватці крові ссавця), підвищенням лізосомних або внутрішньоклітинних рівнів рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини в клітині ссавця, що експресує манозо-6-фосфатний рецептор, або опосередковано, наприклад, за зниженням накопичення глікофінголіпідів з кінцевими α -галактозильними залишками, такими як глоботриаозилцерамід (GL-3), в клітині ссавця, що контактує, або в середовищі для культивування тканин (або в сироватці крові ссавця). Зниження рівнів рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини в середовищі для культивування тканин (або в сироватці крові ссавця), може бути виявлено, наприклад, із застосуванням аналізу з антитілом (наприклад, імуносорбентного аналізу з імобілізованими ферментами) або аналізу активності (наприклад, аналізу активності із застосуванням rNP або 4MU як субстратів). Прикладами антитіл, що зв'язуються з рекомбінантним білком α -галактозидази-А людини, є доступні від Millipore, LifeSpan BioSciences, Inc., Thermo Scientific Pierce Antibodies, Acris Antibodies GmbH і R & D Systems. Способи визначення лізосомних або внутрішньоклітинних рівнів рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини можуть передбачати, наприклад, застосування імуофлуоресцентної мікроскопії, клітинної пермеабілізації та імуоблотингу і/або мас-спектрометрії клітинного або лізосомного лізату. Зниження накопичення глоботриаозилцераміду (GL-3) може бути визначено, наприклад, шляхом виявлення рівнів GL-3 в середовищі для культивування тканин або в сироватці крові ссавця в залежності від часу із застосуванням мас-спектрометрії (наприклад, Kim et al., Korean J. Intern. Med. 25:415-421, 2010) або аналізу з антитілом (наприклад, публікація заявки на патент США № 2012/0178105). У кожному випадку ендоцитоз рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини можна порівнювати з Fabrazyme®.

Способи визначення здатності білка (наприклад, рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини) до зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором відомі з рівня техніки. Наприклад, аналіз для виявлення зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини з асіалоглікопротеїновим рецептором може передбачати стадію приведення в контакт клітини (наприклад, гепатоциту), що експресує асіалоглікопротеїн. Зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини з асіалоглікопротеїновим рецептором, також можна виявити із застосуванням поверхневого плазмонного резонансу (наприклад, методикою Biacore) (див., наприклад, Stokmaier et al., Bioorg. Med. Chem. 17:7254-7264, 2009) або аналізу зв'язування асіалоглікопротеїнового рецептора за допомогою флуоресцентної поляризації, описаного в Kornilova et al. (Anal. Biochem. 425:43-46, 2012). У будь-якому випадку зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини з асіалоглікопротеїновим рецептором можна порівнювати з Fabrazyme®.

Способи визначення зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А з манозо-6-фосфатним рецептором можуть бути здійснені із застосуванням аналізів, що передбачають стадію приведення рекомбінантного білка α -галактозидази-А у контакт з клітиною (наприклад, фібробластом або ендотеліальною клітиною), що експресує манозо-6-фосфатний рецептор. В інших прикладах зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А з манозо-6-фосфатним рецептором може бути визначено із застосуванням поверхневого плазмонного резонансу (наприклад, методикою Biacore) або способів афінної хроматографії. Зв'язування рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини з манозо-6-фосфатним рецептором можна порівнювати з Fabrazyme®.

Типові рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі, може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 3 профілювання міченого антраніловою

кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 1,6% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 1,3% або від приблизно 0,1% до приблизно 1,0%) і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), більш ніж приблизно 7,5% (наприклад, більш ніж приблизно 8,5%, більш ніж приблизно 9,0% або більш ніж приблизно 9,5%). Рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини може, крім того, мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліцьовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), більш ніж приблизно 13,0% (наприклад, більш ніж приблизно 13,5%, більш ніж приблизно 14,0%, більш ніж приблизно 14,5%, більш ніж приблизно 15,0%, більш ніж приблизно 15,5% або більш ніж приблизно 16,0%) і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисігаліцьовані олігосахариди форми 2 (наприклад, пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), більш ніж приблизно 2,0% (наприклад, більш ніж приблизно 2,5%, більш ніж приблизно 3,0%, більш ніж приблизно 3,5%, більш ніж приблизно 4,0%, більш ніж приблизно 4,5%, більш ніж приблизно 5,0%, більш ніж приблизно 5,5%, більш ніж приблизно 6,0%, більш ніж приблизно 6,5% або більш ніж приблизно 7,0%).

Рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини може додатково мати одну або декілька (наприклад, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім або дев'ять) з наступних фізичних характеристик: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 3,9% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5% або від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносігаліцьовані фукозо- вмісні олігосахариди (наприклад, пік 2 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 3,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5% або від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісгаліцьовані олігосахариди (наприклад, пік 5 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), від приблизно 0,1% до приблизно 5,3% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,0% або від приблизно 0,1% до приблизно 2,5%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисігаліцьовані олігосахариди форми 1 (наприклад, пік 6 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 0,1% до приблизно 9,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 8,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 8,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 7,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 3,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 2,5% або від приблизно 0,1% до приблизно 2,0%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить від приблизно 0,1% до приблизно 7,0% (наприклад, від приблизно 0,1% до приблизно 6,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 6,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,5%, від приблизно 0,1% до приблизно 5,0%, від приблизно 0,1% до приблизно 4,5% або від приблизно 0,1% до приблизно 4,0%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання міченого антраніловою кислотою N- зв'язаного олігосахариду), більш ніж приблизно 14,8% (наприклад, більш ніж приблизно 15,0%, більш ніж приблизно 15,5%, більш ніж приблизно 16,0%, більш ніж приблизно 16,5%, більш ніж приблизно 17,0%, більш ніж приблизно 17,5%, більш ніж приблизно 18,0%, більш ніж приблизно 18,5%, більш ніж приблизно 19,0%, більш ніж приблизно 19,5%, більш ніж приблизно 20,0%, більш ніж приблизно 20,5%, більш ніж приблизно 21,0%, більш ніж приблизно 21,5%, більш ніж приблизно 22,0%, більш ніж приблизно 22,5% або більш ніж приблизно 23,0%); відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасігаліцьовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 4,9% (наприклад, більш ніж приблизно 5,0%, більш ніж приблизно 5,5%, більш ніж приблизно 6,0%, більш ніж приблизно 6,5%, більш ніж приблизно 7,0%, більш ніж приблизно 7,5% або більш ніж

приблизно 8,0%); і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані монофосфорильовані гібридні олігосахариди (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який становить більш ніж приблизно 8,2% (наприклад, більш ніж приблизно 8,5%, більш ніж приблизно 9,0%, більш ніж

5 приблизно 9,5% або більш ніж приблизно 10,0%).
Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини також може мати одну або декілька з наступних функціональних ознак: підвищений ендоцитоз (наприклад, підвищена швидкість ендоцитозу) клітиною ссавця, що експресує манозо-6- фосфатний рецептор, знижене зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором і підвищену афінність до манозо-6-фосфатного рецептора, у порівнянні з Fabrazyme®.

10 В інших прикладах рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 3 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який менше ніж в Fabrazyme®, і відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що

15 являють собою біс- манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 11 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який більш ніж в Fabrazyme®. Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини також може мати відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 4 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який є приблизно таким самим або більш ніж в Fabrazyme®, та відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 2 (наприклад, пік 6' профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який є більш ніж в Fabrazyme®.

20 Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини також може мати один або декілька з наступних структурних ознак: відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (наприклад, пік 1 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 2 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який приблизно такий самий або менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 5 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трьохрозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 1 (наприклад, пік 6 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (наприклад, пік 7 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який приблизно такий самий або менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфорильовані олігосахариди (наприклад, пік 8 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який більше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N- зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалільовані олігосахариди (наприклад, пік 9 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який більше ніж в Fabrazyme®; та відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані монофосфорильовані гібридні структури (наприклад, пік 10 профілювання міченого антраніловою кислотою N-зв'язаного олігосахариду), який більше ніж в Fabrazyme®. Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини також може мати одну або декілька з наступних функціональних ознак: підвищений ендоцитоз (наприклад, підвищена швидкість ендоцитозу) клітиною ссавця, що експресує манозо-6- фосфатний рецептор, знижене зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором і підвищену афінність до манозо-6-фосфатного рецептора, кожна у порівнянні з Fabrazyme®.

Вектори експресії

Також представлені в даному документі вектори експресії, що містять послідовність (наприклад, кДНК), яка кодує рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини за даним винаходом. Наприклад, вектор експресії може містити послідовність (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, яка щонайменше на 90% ідентична (наприклад, щонайменше на 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% або 100% ідентична) SEQ ID NO: 1. Крім послідовності вектори експресії можуть містити промотор (і необов'язково одну або декілька енхансерних послідовностей), функціонально пов'язаних з 5'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини. Вектори експресії

можуть містити послідовність, що кодує пептид білка CD52 людини зі стартовим кодоном TTG, функціонально пов'язаним з 5'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок, і послідовність, що кодує полі(А) сайт розпізнавання, функціонально пов'язаний з 3'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок. Вектори експресії можуть містити послідовність (наприклад, кДНК), що кодує маркер добору ссавця (наприклад, білок синтетази людини або собаки), і промоторну послідовність, функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує маркер добору ссавця, і необов'язково інтронну послідовність раннього SV40 і полі(А) сигнальну послідовність, обидві з яких функціонально пов'язані з 3'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує ген добору ссавця. Вектори експресії можуть містити одну або декілька (наприклад, дві або три) з прокаріотичної промоторної послідовності, яка функціонально пов'язана з 5'-кінцем послідовності, що кодує прокаріотичний ген добору (наприклад, ген стійкості до ампіциліну), послідовність точки початку реплікації прокаріот та послідовність точки початку реплікації еукаріот.

Необмежувальні приклади промоторних послідовностей (і необов'язково однієї або декількох енхансерних послідовностей), які можуть бути функціонально пов'язані з послідовністю (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, передбачають ранній промотор вірусу мавпи 40 (SV40), промотор рибосомального білка 21 (рS21), промотор β -актину хом'яка, промотор цитомегаловірусу (CMV) (наприклад, передранній промотор CMV (див., наприклад, Teschendorf et al., *Anticancer Res.* 22:3325-3330, 2002), промотор убіквітину С (UBC), промотор фактора елонгації 1- α (EF1A), промотор фосфоенолпіруват-карбоксикинази (PCK), промоторну/енхансерну ділянку IE2 з CMV миші (див., наприклад, Chatellard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 96:106-117, 2007) і промотор курячого β -актину. Додаткові необмежувальні приклади генних промоторів людини, що можуть бути застосовані у будь-якому з векторів експресії, описаних в даному документі, описуються у базі даних промоторів ссавців (вебсайт інституту Wistar mrpombdb.wistar.upenn.edu). Додаткові приклади промоторних послідовностей ссавців, що можуть бути застосовані у векторах експресії, відомі з рівня техніки. Одним необмежувальним прикладом промотора та енхансера, що можуть бути застосовані в плазміді експресії, є промотор курячого β -актину з енхансером CMV (відомий з рівня техніки як промотор CAGG). Вектори експресії, представлені в даному документі, можуть містити послідовність промотора рS21, промотора β -актину хом'яка або раннього промотора SV40, функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, послідовність, що кодує пептид білка CD52 людини зі стартовим кодоном TTG, функціонально пов'язану з 5'-кінцем нуклеїнової кислоти (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини (наприклад, будь-якої з нуклеїнових кислот, що кодують рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, описаний в даному документі), і послідовність, що містить полі(А) сайт розпізнавання, функціонально пов'язаний з 3'-кінцем послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини.

Необмежувальні приклади послідовностей полі(А) сайту розпізнавання передбачають полі(А) сайт розпізнавання гормону росту великої рогатої худоби. Структурні ознаки полі(А) сайту розпізнавання людини описуються в Nunes et al., *EMBO J.* 29:1523-1536, 2010. Додаткові полі(А) сайти розпізнавання добре відомі з рівня техніки.

У деяких прикладах вектор експресії містить промотор β -актину хом'яка й послідовність, що кодує пептид білка CD52 людини, зі стартовим кодоном TTG, які функціонально пов'язані з 5'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, і ранній інтрон SV40 та полі(А) послідовність розпізнавання, функціонально пов'язану з 3'-кінцем послідовності (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини.

Деякі вектори експресії можуть містити послідовність, що кодує ген добору ссавця. Необмежувальні приклади генів добору ссавця передбачають ген дигідрофолатредуктази, гени стійкості до гідроміцину, гени стійкості до неомицину, гени стійкості до бластицидину, гени стійкості до зеоцину, гени глутамінсинтетази, гени стійкості до дигідрофолату та гени гіпоксантингуанін- фосфорибозилтрансферази. Приклади послідовностей, що кодують ці гени добору ссавця відомі з рівня техніки. 5'-кінець послідовності, що кодує ген добору ссавця може бути функціонально пов'язаний з промотором (наприклад, будь-яким з типових промоторів, описаних в даному документі або відомих з рівня техніки).

Деякі вектори експресії (наприклад, будь-який з векторів експресії, описаних в даному документі) можуть містити послідовність точки початку реплікації ссавців і/або послідовність точки початку реплікації прокаріот. Послідовності точки початку реплікації ссавців відомі з рівня

техніки (наприклад, з Todorovic et al., *Front. Biosci.* 4:D859-D568, 1999; Aladjem, *Front. Biosci.* 9:2540-2547, 2004; Hamlin, *Bioessays* 14:651-659, 1992). Послідовності точки початку реплікації прокариот також відомі з рівня техніки (наприклад, з Marczynski et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:775- 782, 1993).

Необмежувальним прикладом вектора є плазміда. Необмежувальні приклади плазмід, представлених в даному документі, показані на фігурах 3 і 4. На фігурі 3 зображена плазміда, що кодує наступні елементи: нуклеїнова кислота (наприклад, кДНК), що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, промотор (наприклад, промотор β -актину хом'яка), зв'язаний з 5'-кінцем нуклеїнової кислоти, що кодує білок α -галактозидази-А людини, послідовність, що кодує пептид CD52 людини, що має стартовий кодон TTG, який функціонально пов'язаний з 5'-кінцем послідовності, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, полі(А) послідовність розпізнавання (наприклад, полі(А) послідовність розпізнавання раннього SV40), що функціонально пов'язана з 3'-кінцем другою, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує ген (маркер) добору ссавця (наприклад, ген дигідрофолатредуктази або ген глутамінсинтетази людини або собаки), і промоторна послідовність (наприклад, раннього промотора SV40), функціонально пов'язана з 5'-кінцем послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує ген (маркер) добору ссавця. На фігурі 4 зображена плазміда експресії, що містить послідовність, яка кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, промоторну послідовність (наприклад, промотора та інтрона CMV), функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, полі(А) послідовність розпізнавання (наприклад, полі(А) послідовність розпізнавання раннього SV40), функціонально пов'язану з 3'-кінцем послідовності, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, послідовність, що кодує ген (маркер) добору ссавця (наприклад, ген глутамінсинтетази), промоторну послідовність (наприклад, промотора SV40), функціонально пов'язану з 5'-кінцем послідовності, що кодує ген (маркер) добору ссавця, послідовність точки початку реплікації прокариот, послідовність, що кодує прокаріотичний ген (маркер) добору (наприклад, ген стійкості до ампіциліну), прокаріотичну промоторну послідовність, функціонально пов'язану з 5'-кінцем прокаріотичного гена (маркера) добору, і послідовність точки початку реплікації еукариот.

Вектором експресії може бути вірусний вектор. Необмежувальні приклади вірусних векторів передбачають аденовірусні вектори, вектори вірусу герпесу, бакуловірусні вектори та ретровірусні вектори. Вектором експресії також може бути плазміда або косміда.

Клітини-хазяїни

Також в даному документі представлені клітини-хазяїни, що включають послідовність, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, описаний в даному документі. Послідовність може бути функціонально пов'язана з промоторною послідовністю (наприклад, будь-якою з типових промоторних послідовностей, описаних в даному документі, або будь-якою з промоторних послідовностей вірусів або ссавців, відомих з рівня техніки). Наприклад, послідовність, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, і послідовність промоторної послідовності, функціонально пов'язаної з 5'-кінцем послідовності, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, можуть бути інтегровані у хромосому в клітині-хазяїнові. В інших прикладах послідовність, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, і промоторна послідовність, що функціонально пов'язана з 5'-кінцем послідовності, що кодує рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, присутні у векторі експресії (наприклад, будь-якому з векторів експресії, описаних в даному документі) в клітині-хазяїнові.

Способи введення нуклеїнових кислот (наприклад, будь-яких з нуклеїнових кислот або векторів експресії, описаних в даному документі) в клітину (наприклад, клітину-хазяїна ссавця), відомі з рівня техніки. Наприклад, нуклеїнова кислота може бути введена в клітину із застосуванням ліпофекції, електропорації, опосередкованої кальцію фосфатом трансфекції, вірусної (наприклад, ретровірусної) трансдукції, опосередкованої DEAE-декстраном клітинної трансфекції, опосередкованої дендримером трансфекції, ультразвукової порації, оптичної трансфекції, імпафекції, гідродинамічної доставки, магнетофекції або балістичної трансфекції.

Клітиною-хазяїном може бути будь-який тип клітини ссавця. Наприклад, клітиною-хазяїном може бути лінія клітин, наприклад, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) (наприклад, клітини CHO DG44, клітини CHO-K1, клональні клітини C02.31, клональні клітини A14.13, клональні клітини C02.57 і клональні клітини F05.43), Sp2.0, клітини мієломи (наприклад, NS/0), В-клітини, клітини гібридоми, Т-клітини, ембріональні клітини нирки людини (HEK) (наприклад, HEK 293E і HEK 293F), епітеліальні клітини африканської зеленої мавпи (Vero) або епітеліальні клітини нирки собаки Madin-Darby (кокер спанієля) (MDCK). Додаткові клітини ссавця, які можна

культивувати із застосуванням способів, описаних в даному документі, відомі з рівня техніки. Клітиною-хазяїном може бути, наприклад, епітеліальна клітина, ендотеліальна клітина, лімфоцит, клітина нирки, клітина легені, Т-клітина, клітина мієломи або В-клітина. Деякі клітини-хазяїни можна вирощувати в суспензійній культурі клітин або в культурі адгезивних клітин.

5 Способи створення лінії клітин ссавця

Також в даному документі представлені способи створення лінії клітин ссавця, застосовні для рекомбінантної експресії глікопротеїну (наприклад, рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, будь-якого з інших ферментів, приведених в таблиці 1, або будь-якого з інших глікопротеїнів, відомих з рівня техніки). На фігурі 5 представлена блок-схема, що показує стадії, які можуть бути застосовні для створення батьківської лінії клітин, оптимізованої для експресії рекомбінантного глікопротеїну. Способи можуть передбачати забезпечення лінії залежних від сироватки крові іморталізованих клітин і послідовне культивування лінії клітин ссавця в: (1) середовищі для культивування клітин, що передбачає першу концентрацію (1X) сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 12 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 11 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 9 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 8 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 7 днів); (2) середовищі для культивування клітин, що передбачає від приблизно 0,2X до приблизно 0,4X (наприклад, від приблизно 0,2X до приблизно 0,3X) концентрацію сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 12 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 11 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 9 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 8 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 7 днів); і (3) середовищі для культивування клітин, що передбачає від приблизно 0,01X до приблизно 0,25X (наприклад, від приблизно 0,01X до приблизно 0,20X, від приблизно 0,01X до приблизно 0,15X або від приблизно 0,01X до приблизно 0,08X) сироватки крові тварин, протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 12 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 11 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 9 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 8 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 7 днів), створення культур одноклітинних субклонів з культури після послідовного культивування й відбір субклону, що має прийнятну трансфекційну ефективність, клітинний ріст у безсироватковому середовищі для культивування і рекомбінантну експресію білка; і культивування відібраного субклону у безбілковому, безсироватковому середовищі з визначеним хімічним складом протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 12 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 11 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 9 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 8 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 7 днів); створення культур одноклітинних субклонів з культури після культивування у безбілковому, безсироватковому середовищі з визначеним хімічним складом і відбір субклону, що має прийнятні трансфекційну ефективність, пікову щільність клітин, ростові властивості, об'ємну продуктивність (VPR) і профіль глікозилювання для глікопротеїну, де відібраний субклон з (f) є застосовним для рекомбінантної експресії глікопротеїну.

Також представлені способи створення лінії клітин ссавця, застосовні для рекомбінантної експресії глікопротеїну (наприклад, будь-якого з рекомбінантних білків, описаних в даному документі або відомих з рівня техніки), що передбачають (а) одержання лінії залежних від сироватки крові іморталізованих клітин і послідовне культивування лінії клітин ссавця в: (1) середовищі для культивування клітин, що передбачає першу концентрацію (1X) (наприклад, приблизно 5%) сироватки крові тварин (наприклад, фетальної бичачої сироватки крові) протягом від приблизно 1 дня до приблизно 30 днів (наприклад, приблизно 2 днів до приблизно 25 днів, приблизно 2 днів до приблизно 20 днів, приблизно 2 днів до приблизно 15 днів, приблизно 2 днів до приблизно 12 днів, приблизно 2 днів до приблизно 11 днів, приблизно 2 днів до приблизно 10 днів, приблизно 2 днів до приблизно 9 днів, приблизно 2 днів до приблизно 8 днів або приблизно 2 днів до приблизно 7 днів); (2) середовищі для культивування клітин, що передбачає від приблизно 0,2X до приблизно 0,6X (наприклад, від приблизно 0,2X до

приблизно 0,5X) концентрацію сироватки крові тварин (наприклад, фетальної бичачої сироватки крові) протягом від приблизно 1 дня до приблизно 30 днів (наприклад, приблизно 2 днів до приблизно 25 днів, приблизно 2 днів до приблизно 20 днів, приблизно 2 днів до приблизно 15 днів, приблизно 2 днів до приблизно 12 днів, приблизно 2 днів до приблизно 11 днів, приблизно 2 днів до приблизно 10 днів, приблизно 2 днів до приблизно 9 днів, приблизно 2 днів до приблизно 8 днів або приблизно 2 днів до приблизно 7 днів); і (3) середовищі для культивування клітин, що передбачає приблизно 0X до приблизно 0,20X (наприклад, приблизно 0X до приблизно 0,15X, приблизно 0X до приблизно 0,10X або приблизно 0X до приблизно 0,05X) сироватки крові тварин (наприклад, фетальної бичачої сироватки крові) протягом від приблизно 5 днів до приблизно 30 днів (наприклад, від приблизно 5 днів до приблизно 25 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 20 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 15 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 12 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 11 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 10 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 9 днів, від приблизно 5 днів до приблизно 8 днів або від приблизно 5 днів до приблизно 7 днів); (b) створення культур одноклітинних субклонів з культури після послідовного культивування, і відбір культури субклону, що має прийнятні трансфекційну ефективність, клітинний ріст у безсироватковому середовищі для культивування і рекомбінантну експресію білка (наприклад, відбір культури субклону, що має найкращу трансфекційну ефективність, клітинний ріст і рекомбінантну експресію білка у порівнянні з іншими тестованими культурами субклонів); (c) створення культур одноклітинних субклонів з відібраної культури субклону в (b); і (d) відбір культури одноклітинного субклону, створеної в (c), що має прийнятні трансфекційну ефективність, пікову щільність клітин (наприклад, пікову щільність клітин в безсироватковому середовищі), ростові властивості (наприклад, ріст в безсироватковому середовищі), об'ємну продуктивність (VPR) і рекомбінантну експресію білка, де відібраний субклон з (d) є застосовним для рекомбінантної експресії глікопротеїну (наприклад, культура субклону, що має найкращу трансфекційну ефективність, пікову щільність клітин, ростові властивості, VPR і рекомбінантну експресію білка) у порівнянні з іншими тестованими культурами субклону).

Також в даному документі представлені клітини ссавця або лінії клітин ссавця, отримані будь-яким із способів, описаних в даному документі. Необмежувальні приклади залежних від сироватки крові іморталізованих клітин, які можуть бути застосовані у будь-якому із способів, описаних в даному документі, передбачають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини мієломи, В- клітини, клітини гібридоми, Т-клітини, ембріональні клітини нирки людини (НЕК), епітеліальні клітини африканської зеленої мавпи (Vero) та епітеліальні клітини нирки собаки Madin-Darby (кокер спанієля) (MDCK). Інші лінії залежних від сироватки крові іморталізованих клітин, що можуть бути застосовані в будь-якому із способів, описаних в даному документі, відомі з рівня техніки. Наприклад, залежною від сироватки крові лінією іморталізованих клітин може бути лінія епітеліальних клітин, лінія ендотеліальних клітин, лінія клітин-лімфоцитів, лінія клітин нирки, лінія клітин легені, лінія Т-клітин, лінія клітин мієломи або лінія В- клітин. У деяких прикладах залежна від сироватки крові лінія іморталізованих клітин зростає у суспензії. В інших прикладах залежна від сироватки крові лінія іморталізованих клітин зростає в культурі адгезивних клітин.

У деяких прикладах залежна від сироватки крові лінія іморталізованих клітин ендегенно не експресує дигідрофолатредуктазу. Відібраний субклон (або перший, або другий субклон, відібраний в способах) може зростати в суспензії.

Способи культивування лінії іморталізованих клітин ссавця відомі з рівня техніки. Способи визначення ефективності трансфекції, клітинного росту у безсироватковому середовищі для культивування, рекомбінантної експресії білка, пікової щільності клітин (наприклад, пікової щільності життєздатних клітин), ростових властивостей клітин, об'ємної продуктивності та профілю глікозилювання отриманого рекомбінантного білка, добре відомі з рівня техніки. Наприклад, ефективність трансфекції може бути визначена шляхом виявлення рівня експресії репортерного гена у плазміді експресії, трансфектованої в клітину (наприклад, експресію такого репортерного гена можна виявити із застосуванням сортування клітин за допомогою флуоресценції). Рекомбінантна експресія білка, наприклад, може бути визначена шляхом виявлення рівнів рекомбінантного білка, присутнього в середовищі для культивування тканин або в клітині із застосуванням антитіла, яке специфічно зв'язується з рекомбінантним білком. Рекомбінантна експресія білка може передбачати, наприклад, одне або обидва з антитіла або ферменту (наприклад, рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини або будь-якого з ферментів, приведених на фігурі 1). Пікову щільність клітин і клітинний ріст можна оцінювати, наприклад, шляхом вимірювання щільності клітин (наприклад, щільності життєздатних клітин) в залежності від часу у культурі клітин (наприклад, із застосуванням гемоцитометра або іншого із

комерційно доступних автоматичних лічильників клітин). Об'ємна продуктивність клітини може бути визначена із застосуванням способів, відомих з рівня техніки, шляхом оцінювання рівнів рекомбінантного білка, присутнього в середовищі для культивування клітин або в клітині в залежності від часу. Профіль глікозилювання рекомбінантного глікопротеїну, продукованого клітиною, може бути визначений, наприклад, із застосуванням будь-якого із способів, описаних в розділі Приклади даного опису (наприклад, дериватизація 2-амінобензойною кислотою (AA) і виявлення за допомогою капілярного електрофорезу з індукованою лазером флуоресценцією).

З рівня техніки добре відомо, що лінію клітин ссавця, отриману способами, описаними в даному документі, можна зберігати при низькій температурі (наприклад -20°C, нижче -30°C, нижче -40°C, нижче -50°C, нижче -60°C, нижче -70°C або нижче -80°C) до подальшого застосування. Способи отримання маточних культур лінії клітин ссавця для зберігання при низьких температурах описані, наприклад, в Hewitt, *Methods Mol Biol.* 640:83-105, 2010, і Phelan, *Curr. Protoc. Hum. Genet. Appendix 3:3G*, 2006). У деяких прикладах лінії клітин ссавця, отримані способами, описаними в даному документі, не піддаються середовищу, що містить сироватку крові, і/або середовищу для культивування, що містить сироватку крові (наприклад, до зберігання та/або після зберігання). У деяких прикладах лінії клітин ссавця, отримані способами, описаними в даному документі, культивують тільки в середовищі для культивування без компонентів тваринного походження (ADC). У деяких прикладах лінії клітин ссавця, отримані способами, описаними в даному документі, культивують тільки в безсироватковому, безбілковому ростовому середовищі з визначеним хімічним складом.

Способи отримання рекомбінантного глікопротеїну

Також в даному документі представлені способи отримання рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, будь-якого з ферментів, приведених на фігурі 1, або будь-якого рекомбінантного глікопротеїну, відомого з рівня техніки). Ці способи передбачають одержання клітини ссавця, отриманої будь-яким із способів, описаних в даному документі, введення в клітину нуклеїнової кислоти (наприклад, вектора експресії), що містить послідовність, що кодує глікопротеїн (наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, будь-який з ферментів, описаних на фігурі 1, і будь-який інший глікопротеїн, відомий з рівня техніки), культивування клітини в безсироватковому середовищі для культивування в умовах, достатніх для продукування глікопротеїну, і збирання глікопротеїну з клітини або з ростового середовища для культивування. Також представлені рекомбінантні глікопротеїни (наприклад, рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини), отримані будь-яким із способів, описаних в даному документі.

В деяких випадках нуклеїновою кислотою, що включає послідовність, що кодує глікопротеїн, є вектор експресії (наприклад, будь-який з векторів експресії, описаних в даному документі). В інших прикладах нуклеїнова кислота, що включає послідовність, що кодує глікопротеїн, інтегрована в хромосому клітини ссавця.

У деяких прикладах культивування здійснюють із застосуванням суспензійної культури клітин. В інших прикладах культивування здійснюють із застосуванням ряду мікроносіїв, що мають поверхню, яка забезпечує приєднання та ріст клітини ссавця. Ряд мікроносіїв може мати середній діаметр, наприклад, від приблизно 20 мкм до приблизно 1 мм (наприклад, від приблизно 20 мкм до приблизно 250 мкм, від приблизно 100 мкм до приблизно 250 мкм, від приблизно 150 мкм до приблизно 250 мкм, від приблизно 250 мкм до 500 мкм, від приблизно 200 мкм до приблизно 300 мкм, від приблизно 750 мкм до 1 мм, від приблизно 200 мкм до приблизно 800 мкм, від приблизно 200 мкм до приблизно 500 мкм або від приблизно 500 мкм до приблизно 800 мкм), де мікроносії мають поверхню, яка дозволяє або забезпечує приєднання клітини ссавця (наприклад, будь-якої з клітин ссавця, описаних в даному документі або відомих з рівня техніки). У деяких прикладах мікроносій може містити одну або декілька пор (наприклад, одну або декілька пор з середнім діаметром від приблизно 10 мкм до приблизно 100 мкм). В деяких випадках поверхні мікроносіїв і/або поверхня однієї або декількох пор у багатьох мікроносіїв покриті засобом, що забезпечує приєднання клітини ссавця до мікроносія (наприклад, приєднання до зовнішньої поверхні мікроносіїв і/або до поверхні пор в мікроносії). Мікроносії можуть бути приблизно сферичними або еліпсоїдними за формою. За деякими варіантами здійснення мікроносії мають зовнішню поверхню, і/або пори мікроносія мають поверхню, яка є позитивно зарядженою (наприклад, позитивно зарядженою через присутність N,N-діетиламіноетильних груп). Необмежувальні типові мікроносії, які можуть бути застосовані у будь-якому із способів, описаних в даному документі, включають CytoPore™ 1 і CytoPore™ 2 (доступний від GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, New Jersey). Додаткові приклади мікроносіїв, які можуть бути застосовані для культивування, загально доступні й відомі з рівня техніки.

У деяких прикладах культивування здійснюють із застосуванням біореактора. Біореактор може мати об'єм, наприклад, від приблизно 1 л до приблизно 10000 л (наприклад, від приблизно 1 л до приблизно 50 л, від приблизно 50 л до приблизно 500 л, від приблизно 500 л до приблизно 1000 л, від 500 л до приблизно 5000 л, від приблизно 500 л до приблизно 10000 л, від приблизно 5000 л до приблизно 10000 л, від приблизно 1 л до приблизно 10000 л, від приблизно 1 л до приблизно 8000 л, від приблизно 1 л до приблизно 6000 л, від приблизно 1 л до приблизно 5000 л, від приблизно 100 л до приблизно 5000 л, від приблизно 10 л до приблизно 100 л, від приблизно 10 л до приблизно 4000 л, від приблизно 10 л до приблизно 3000 л, від приблизно 10 л до приблизно 2000 л або від приблизно 10 л до приблизно 1000 л). Кількість рідкого середовища для культивування, присутнього у біореакторі, може складати, наприклад, від приблизно 0,5 л до приблизно 5000 л (наприклад, від приблизно 0,5 л до приблизно 25 л, від приблизно 25 л до приблизно 250 л, від приблизно 250 л до приблизно 500 л, від 250 л до приблизно 2500 л, від приблизно 250 л до приблизно 5000 л, від приблизно 2500 л до приблизно 5000 л, від приблизно 0,5 л до приблизно 5000 л, від приблизно 0,5 л до приблизно 4000 л, від приблизно 0,5 л до приблизно 3000 л, від приблизно 0,5 л до приблизно 2500 л, від приблизно 50 л до приблизно 2500 л, від приблизно 5 л до приблизно 50 л, від приблизно 5 л до приблизно 2000 л, від приблизно 5 л до приблизно 1500 л, від приблизно 5 л до приблизно 1000 л або від приблизно 5 л до приблизно 500 л). Культивування клітин може бути здійснено, наприклад, із застосуванням біореактора з підживленням або перфузійного біореактора. Культивування може бути здійснено шляхом культивування з підживленням або перфузійного культивування (наприклад, у біореакторі).

Внутрішня поверхня будь-якого з біореакторів, описаних в даному документі, може мати щонайменше одне покриття (наприклад, щонайменше одне покриття з желатину, колагену, полі-L-орнітину, полістиролу й ламініну), та, як відомо з рівня техніки, один або декілька отворів для барботування O_2 , CO_2 і N_2 крізь рідке середовище для культивування та механізм перемішування для збовтування рідкого середовища для культивування. Біореактор може інкубувати культуру клітин в атмосфері з контрольованою вологістю (наприклад, при вологості більш ніж 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% або 95%, або при вологості 100%). Біореактор також може бути оснащений механічним пристроєм, який здатний вилучати об'єм рідкого середовища для культивування з біореактора, і необов'язково фільтр в механічному пристрої, що вилучає клітини з рідкого середовища для культивування протягом процесу перенесення рідкого середовища для культивування з біореактора (наприклад, система змінного тангенціального потоку (ATF) або фільтрації в тангенціальному потоці (TFF)). Культивування може передбачати піддавання рідкого середовища для культивування у біореакторі атмосфері, що містить максимум або приблизно 15% CO_2 (наприклад, максимум або приблизно 14% CO_2 , 12% CO_2 , 10% CO_2 , 8% CO_2 , 6% CO_2 , 5% CO_2 , 4% CO_2 , 3% CO_2 , 2% CO_2 або максимум або приблизно 1% CO_2).

Культивування можна здійснювати при температурі від приблизно 31°C до приблизно 40°C. Фахівцям буде зрозуміло, що температура може бути змінена в конкретній точці(ях) часу протягом культивування, наприклад, погодинно або щодня. Наприклад, температура може бути змінена або зміщена (наприклад, підвищена або знижена) через приблизно один день, два дні, три дні, чотири дні, п'ять днів, шість днів, сім днів, вісім днів, дев'ять днів, десять днів, одинадцять днів, дванадцять днів, чотирнадцять днів, п'ятнадцять днів, шістнадцять днів, сімнадцять днів, вісімнадцять днів, дев'ятнадцять днів або приблизно двадцять днів або більше після початкового засівання біореактора клітиною ссавця). Наприклад, температура може бути зміщена вгору (наприклад, змінена до або до приблизно 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, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, або до, або до приблизно 20°C). Наприклад, температура може бути зміщена вниз (наприклад, змінена до більш ніж 0,05°C або приблизно 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, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, або до, або до приблизно 20°C).

Культивування може бути здійснено із застосуванням безбілкового, безсироваткового середовища з визначеним хімічним складом. Необмежувальні приклади такого середовища відомі з рівня техніки та є комерційно доступними. Необмежувальні приклади застосовного середовища для культивування передбачають, наприклад, CD CHO, Opti CHO і Forti CHO (усі доступні від Life Technologies; Grand Island, NY), середовище Hycell CHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), середовище Ex-cell CD CHO Fusion (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO) і середовище PowerCHO (Lonza Group, Ltd.; Basel, Switzerland).

Клітиною ссавця може бути будь-яка з клітин ссавця, описаних в даному документі. Наприклад, клітиною ссавця може бути клітина CHO. Клітиною ссавця може бути клітина, яка

ендогенно не експресує дигідрофолатредуктазу (наприклад, клітина CHO, яка ендогенно не експресує дигідрофолатредуктазу).

Рекомбінантним глікопротеїном може бути фермент (наприклад, білок α -галактозидази-A людини, будь-який з білків, наведених на фігурі 1, або будь-який інший глікопротеїн, відомий з рівня техніки) або антитіло або його фрагмент, що зв'язує антиген. У деяких прикладах нуклеїнова кислота (наприклад, вектор експресії) включає послідовність, яка щонайменше на 90% (наприклад, щонайменше на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%) ідентична SEQ ID NO: 1. Нуклеїнова кислота (наприклад, вектор експресії) може містити промоторну послідовність, функціонально пов'язану з 5'-кінцем нуклеїнової кислоти, що кодує глікопротеїн, послідовність, яка кодує пептид білка CD52 людини зі стартовим кодоном TTG, функціонально пов'язаним з 5'-кінцем нуклеїнової кислоти, що кодує глікопротеїн, і послідовність, яка кодує полі(A) сайт розпізнавання, функціонально пов'язаний з 3'-кінцем нуклеїнової кислоти, що кодує глікопротеїн. Наприклад, промоторна послідовність може бути вибрана з групи, що складається з промотора грS21 хом'яка, промотора β -актину хом'яка й раннього промотора SV40. Послідовність, що кодує полі(A) сайт розпізнавання може бути послідовністю полі(A) сайту розпізнавання раннього SV40. У деяких прикладах промоторною послідовністю може бути промотор β -актину хом'яка, а полі(A) послідовністю розпізнавання є послідовність полі(A) сайту розпізнавання раннього SV40. У деяких прикладах нуклеїнова кислота додатково містить послідовність, що кодує глутамінсинтеазу людини або собаки (наприклад, де 5'-кінець нуклеїнової кислоти, що кодує глутамінсинтеазу людини або собаки, функціонально пов'язаний з раннім промотором SV40, а 3'-кінець нуклеїнової кислоти, що кодує глутамінсинтеазу людини або собаки, функціонально пов'язаний з інтроном раннього SV40 і полі(A) сигнальною послідовністю). У деяких прикладах нуклеїнова кислота додатково містить послідовність, що кодує дигідрофолатредуктазу (DHFR) (наприклад, DHFR людини або миші) (наприклад, де 5'-кінець нуклеїнової кислоти, що кодує дигідрофолатредуктазу, функціонально пов'язаний з раннім промотором SV40, а 3'-кінець нуклеїнової кислоти, що кодує дигідрофолатредуктазу, функціонально пов'язаний з раннім інтроном SV40 і полі(A) сигнальною послідовністю).

Культивування може бути здійснено із застосуванням перфузійного біореактора. Перфузійне культивування добре відомо з рівня техніки й передбачає вилучення з біореактора першого об'єму першого рідкого середовища для культивування (наприклад, що включають будь-які концентрації клітин ссавця, наприклад, перший об'єм першого рідкого середовища для культивування, що практично не містить клітини) і додавання до першого рідкого середовища для культивування другого об'єму другого рідкого середовища для культивування. Вилучення й додавання може бути здійснено одночасно або послідовно або з комбінації цих двох варіантів. Крім того, вилучення й додавання можна здійснювати безперервно (наприклад, при швидкості, при якій вилучається й замінюється об'єм від 0,1% до 800% (наприклад, від 1% до 700%, від 1% до 600%, від 1% до 500%, від 1% до 400%, від 1% до 350%, від 1% до 300%, від 1% до 250%, від 1% до 100%, від 100% до 200%, від 5% до 150%, від 10% до 50%, від 15% до 40%, від 8% до 80% і від 4% до 30%) об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культивування за будь-який даний період часу (наприклад, за 24-годинний період, за інкрементальний період часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або за інкрементальний період часу більш ніж 24 години)), або періодично (наприклад, один раз кожного третього дня, через день, один раз в день, двічі на день, три рази на день, чотири рази на день або п'ять разів на день), або з будь-якою комбінацією цих варіантів. При періодичному здійсненні об'єм, який вилучають або замінюють (наприклад, за приблизно 24-годинний період, за інкрементальний період часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або за інкрементальний період часу більш ніж 24 години), можуть становити, наприклад, від 0,1% до 800% (наприклад, від 1% до 700%, від 1% до 600%, від 1% до 500%, від 1% до 400%, від 1% до 300%, від 1% до 200%, від 1% до 100%, від 100% до 200%, від 5% до 150%, від 10% до 50%, від 15% до 40%, від 8% до 80% і від 4% до 30%) об'єму біореактора або першого об'єму рідкого середовища для культивування. Перший об'єм першого рідкого середовища для культивування, що вилучають, і другий об'єм другого рідкого середовища для культивування, що додають, може в деяких випадках підтримуватися приблизно однаковим протягом кожного 24-годинного періоду (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 годин) протягом усього або частини періоду культивування. Як відомо з рівня техніки, швидкість, при якій вилучають перший об'єм першого рідкого середовища для культивування (об'єм/одинаця часу), і швидкість, при якій додають другий об'єм другого рідкого середовища для культивування (об'єм/одинаця часу), можуть варіювати. Швидкість, при якій вилучають перший об'єм першого

рідкого середовища для культивування (об'єм/одинаця часу), і швидкість, при якій додають другий об'єм другого рідкого середовища для культивування (об'єм/одинаця часу), можуть бути приблизно однаковими або можуть біти різними.

Як альтернатива, об'єм, що вилучають і додають, може змінюватися (наприклад, поступово підвищуватися) протягом кожного 24-годинного періоду (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 години) в ході періоду культивування. Наприклад, об'єм першого рідкого середовища для культивування, що вилучають, та об'єм другого рідкого середовища для культивування, що додають, за кожний 24-годинний період (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 години), за період культивування можуть бути підвищені (наприклад, поступово або ступінчастими кроками) від об'єму, який становить від 0,5% до приблизно 20% об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культивування до від приблизно 25% до приблизно 150% об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культивування.

Фахівцям буде зрозуміло, що перше рідке середовище для культивування і друге рідке середовище для культивування можуть бути середовищами одного типу (наприклад, безсироватковим або безсироватковим, безбілковим середовищем з визначеним хімічним складом). В інших випадках перше рідке середовище для культивування і друге рідке середовище для культивування можуть бути різними.

Перший об'єм першого рідкого середовища для культивування може бути вилучений, наприклад, із застосуванням механічної системи й/або за допомогою просочування або гравітаційного потоку об'єму крізь стерильну мембрану з відсіканням за молекулярною масою, при цьому виключаються клітини ссавця, присутні в об'ємі.

Другий об'єм другого рідкого середовища для культивування може бути доданий до першого рідкого середовища для культивування автоматично, наприклад, перфузійним насосом. В деяких випадках вилучення першого об'єму першого рідкого середовища для культивування (наприклад, першого об'єму першого рідкого середовища для культивування, що практично не містить клітин ссавця) і додавання до першого рідкого середовища для культивування другого об'єму другого рідкого середовища для культивування не відбувається протягом щонайменше 1 години (наприклад, протягом 2 годин, протягом 3 годин, протягом 4 годин, протягом 5 годин, протягом 6 годин, протягом 7 годин, протягом 8 годин, протягом 9 годин, протягом 10 годин, протягом 12 годин, протягом 14 годин, протягом 16 годин, протягом 18 годин, протягом 24 годин, протягом 36 годин, протягом 48 годин, протягом 72 годин, протягом 96 годин або після 96 годин) після засівання біореактора клітиною ссавця.

Як альтернатива або додатково, культивування може бути здійснено із застосуванням біореактора з підживленням. Таке культивування є відомим з рівня техніки та передбачає протягом більшої частини періоду культивування додавання (наприклад, періодичне або безперервне додавання) до першого рідкого середовища для культивування другого об'єму другого рідкого середовища для культивування. Додавання другого рідкого середовища для культивування може бути здійснено безперервно (наприклад, при швидкості додавання об'єму від 0,1% до 300% (наприклад, від 1% до 250%, від 1% до 100%, від 100% до 200%, від 5% до 150%, від 10% до 50%, від 15% до 40%, від 8% до 80% і від 4% до 30%) об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культур за будь-який даний період часу (наприклад, за 24-годинний період, за інкрементальний період часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або за інкрементальний період часу більш ніж 24 години)), або періодично (наприклад, один раз кожного третього дня, через день, один раз в день, двічі на день, три рази на день, чотири рази на день або п'ять разів на день), або з будь-якою комбінацією цих варіантів. При періодичному здійсненні об'єм, який додають (наприклад, за приблизно 24-годинний період, за інкрементальний період часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або за інкрементальний період часу більш ніж 24 години), можуть становити, наприклад, від 0,1% до 300% (наприклад, від 1% до 200%, від 1% до 100%, від 100% до 200%, від 5% до 150%, від 10% до 50%, від 15% до 40%, від 8% до 80% і від 4% до 30%) об'єму біореактора або першого об'єму рідкого середовища для культивування. Другий об'єм другого рідкого середовища для культивування, що додають, може в деяких випадках підтримуватися приблизно однаковим протягом кожного 24-годинного періоду (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від приблизно 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 годин) протягом усього або частини періоду культивування. Як відомо з рівня техніки, швидкість, при якій додають другий об'єм другого рідкого середовища для культивування (об'єм/одинаця часу), може варіювати протягом усього або частини періоду

культивування. Наприклад, об'єм другого рідкого середовища для культивування, що додають, може змінюватися (наприклад, поступово підвищуватися) протягом кожного 24-годинного періоду (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 години) в ході періоду культивування. Наприклад, об'єм другого рідкого середовища для культивування, що додають, за кожний 24-годинний період (або, як альтернатива, протягом інкрементального періоду часу від 1 години до приблизно 24 годин або інкрементального періоду часу більш ніж 24 години), за період культивування можуть бути підвищені (наприклад, поступово або ступінчастими кроками) від об'єму, який становить від 0,5% до приблизно 20% об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культивування до від приблизно 25% до приблизно 150% об'єму біореактора або об'єму першого рідкого середовища для культивування. Швидкість, при якій додають другий об'єм другого рідкого середовища для культивування (об'єм/одиниця часу), може бути приблизно однаковою протягом усього або частини періоду культивування.

Фахівцям буде зрозуміло, що перше рідке середовище для культивування і друге рідке середовище для культивування можуть бути середовищами одного типу (наприклад, безбілковим середовищем для культур або безсироватковим, безбілковим середовищем з визначеним хімічним складом). В інших випадках першим рідким середовищем для культивування може бути тип, який відрізняється від другого рідкого середовища для культивування. Об'єм другого рідкого середовища для культур може бути доданий до першого рідкого середовища для культивування автоматично, наприклад, перфузійним насосом.

В деяких випадках додавання до першого рідкого середовища для культивування другого об'єму другого рідкого середовища для культивування не відбувається через щонайменше 1 годину, але не більш ніж 7 днів після засівання біореактора клітиною ссавця (наприклад, до щонайменше 2 годин, протягом 3 годин, протягом 4 годин, протягом 5 годин, протягом 6 годин, протягом 7 годин, протягом 8 годин, протягом 9 годин, протягом 10 годин, протягом 12 годин, протягом 14 годин, протягом 16 годин, протягом 18 годин, протягом 24 годин, протягом 36 годин, протягом 48 годин, протягом 72 годин, протягом 96 годин або через 96 годин, але не більш ніж 7 днів після засівання біореактора клітиною ссавця). Клітинне середовище для культивування в культурах з підживленням зазвичай збирають наприкінці періоду культивування, однак, середовище для культивування клітин в культурах з підживленням також можна збирати в одну або декілька точок часу протягом періоду культивування.

Фахівцям буде зрозуміло, що будь-який з різних параметрів культивування (наприклад, біореактор, об'єми, швидкості або частоти заміни об'ємів культури, перемішування, температури, середовище для культивування і/або концентрації CO₂), згадані в даному документі, можуть бути застосовані у будь-якій комбінації при здійсненні цих способів.

Може бути здійснена додаткова стадія виділення рекомбінантного глікопротеїну. Як добре відомо з рівня техніки, такі способи відрізняються в залежності від фізичних властивостей та активностей глікопротеїну. Наприклад, параметри, такі як специфічність зв'язування глікопротеїну (наприклад, субстратна або активність зв'язування антигену), сумарний заряд і/або розмір, треба враховувати при розробці стадій для виділення рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, з середовища для культивування або з клітини). Один або декілька будь-яких з наступних способів можуть бути застосовані для виділення рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, рекомбінантного глікопротеїну, отриманого із застосуванням будь-якого із способів, описаних в даному документі): афінна колонкова хроматографія, іоно- (наприклад, катіоно- або аніоно-) обмінна колонкова хроматографія, ексклюзійна колонкова хроматографія, зворотно-фазова колонкова хроматографія, фільтрація й осадження. Необмежувальні способи виділення рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини описані в прикладах.

У деяких прикладах виділення рекомбінантного глікопротеїну з рідкого середовища для культивування може бути здійснено із застосуванням інтегрованого безперервного процесу (наприклад, процесу, що передбачає застосування щонайменше двох хроматографічних систем з кількома колонками (MCCS)). Необмежувальні приклади інтегрованих безперервних процесів для виділення рекомбінантного глікопротеїну описані в попередніх заявках на патенти США №№ 61/775060 і 61/856390, а також WO 14/137903. Необмежувальні приклади інтегрованих та безперервних процесів виділення rhAGA, представленого у даному документі, з рідкого середовища для культивування описані нижче.

Способи, описані в даному документі, додатково можуть передбачати складання виділеного рекомбінантного глікопротеїну у фармацевтично прийнятному допоміжному засобі або буфері (наприклад, для введення суб'єкту). Такі способи додатково можуть передбачати стерильне фільтрування, інактивацію вірусів, UV опромінення й/або ліофілізацію або будь-яку їх

комбінацію.

Інтегровані й безперервні процеси виділення білка rhAGA

Представлений у даному документі rhAGA можна виділяти із застосуванням інтегрованого й безперервного процесів. Способи виділення рекомбінантного білка із застосуванням інтегрованого і безперервного процесів і деталі стосовно стадії таких процесів відомі з рівня техніки. Див. WO 14/137903 та публікацію заявки на патент США № 2014/0225994. Крім того, в WO 14/137903 також описуються системи й обладнання, які можна застосовувати для виконання цих інтегрованих і безперервних процесів.

Наприклад, інтегрований і безперервний процеси для виділення білка rhAGA, представленого у даному документі, можуть включати: (а) забезпечення рідкого середовища для культивування, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, що практично не містить клітин, де рідке середовище для культивування подають у першу хроматографічну систему з кількома колонками (MCCS1); (b) захоплення білка rhAGA, представленого у даному документі, у рідкому середовищі для культивування із застосуванням MCCS1, де елюат MCCS1, який містить білок rhAGA, представлений у даному документі, безперервно подають у другу хроматографічну систему з кількома колонками (MCCS2); і (c) очищення й доочищення білка rhAGA, представленого у даному документі, із застосуванням MCCS2, де елюат з MCCS2 являє собою виділений білок rhAGA, представлений у даному документі, або являє собою білкову лікарську речовину rhAGA, і процес є інтегрованим і безперервно протікає з рідкого середовища для культивування в елюат з MCCS2, який являє собою виділений білок rhAGA, представлений у даному документі, або білкову лікарську речовину rhAGA.

MCCS1 та/або MCCS2 можуть, наприклад, виконувати щонайменше дві елементарні операції. У деяких варіантах здійснення MCCS1 або MCCS2, або обидві, передбачають перемикання колонок. У деяких варіантах здійснення MCCS1 виконує елементарні операції захоплення білка rhAGA, представленого у даному документі, та інактивації вірусів. У деяких варіантах здійснення MCCS2 виконує елементарні операції очищення та доочищення білка rhAGA, представленого у даному документі.

У MCCS1 і/або MCCS2 можна застосовувати, наприклад, щонайменше дві хроматографічні колонки. У MCCS1 і/або MCCS2 можна застосовувати, наприклад, щонайменше дві хроматографічні мембрани. У MCCS1 і/або MCCS2 можна застосовувати, наприклад, щонайменше одну хроматографічну колонку та щонайменше одну хроматографічну мембрану.

MCCS1 може являти собою, наприклад, періодичну протиточну хроматографічну систему (PCCS1). PCCS1 може являти собою, наприклад, PCCS з чотирма колонками. У деяких варіантах здійснення чотири колонки у PCCS з чотирма колонками можуть виконувати елементарну операцію захоплення білка rhAGA, представленого у даному документі, у рідкому середовищі для культивування. Захоплення можна виконувати із застосуванням, наприклад, афінної хроматографії, катіон-обмінної хроматографії, аніон-обмінної хроматографії або хроматографії на молекулярних ситах. Афінну хроматографію можна виконувати за допомогою механізму захоплення, вибраного з, наприклад, механізму захоплення із зв'язуванням білка А, механізму захоплення із зв'язуванням субстрату, механізму захоплення антитіла або фрагмента антитіла, механізму захоплення зі зв'язуванням аптамеру та механізму зв'язування кофактора. Елюат, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, з трьох із чотирьох колонок у PCCS з чотирма колонками можна подавати у четверту колонку PCCS з чотирма колонками. Четверта колонка PCCS з чотирма колонками може виконувати елементарну операцію, наприклад, інактивації вірусів шляхом утримування елюату, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, при низькому рН для інактивації вірусів. Наприклад, четверта колонка PCCS з чотирма колонками може утримувати елюат, що містить білок rhAGA, представлений у даному документі, при низькому рН для інактивації вірусів протягом періоду часу від приблизно 10 хвилин до приблизно 1,5 години.

У деяких варіантах здійснення MCCS2 може являти собою, наприклад, періодичну протиточну хроматографічну систему (PCCS2). У деяких прикладах процес додатково включає стадію регулювання рН елюату з четвертої колонки PCCS з чотирма колонками із застосуванням поточного резервуару для регулювання буфера до того, як елюат з четвертої колонки PCCS з чотирма колонками подають у PCCS2.

PCCS2 може, наприклад, містити три хроматографічні колонки та хроматографічну мембрану. Три хроматографічні колонки у PCCS2 можуть виконувати, наприклад, елементарну операцію очищення білка rhAGA, представленого у даному документі (наприклад, за допомогою катіон- або аніонобмінної хроматографії). Елюат з трьох колонок у PCCS2 можна подавати, наприклад, на хроматографічну мембрану у PCCS2. Хроматографічна мембрана у PCCS2 може, наприклад, виконувати елементарну операцію доочищення білка rhAGA, представленого

у даному документі, у елюаті з трьох хроматографічних колонок у PCCS2 (наприклад, за допомогою катіон- або аніонобмінної хроматографії). Потік крізь хроматографічну мембрану та омивання її може виконувати виділений білок rhAGA, представлений у даному документі, або білкова лікарська речовина rhAGA.

Деякі приклади додатково включають регулювання іонної концентрації елюату з трьох колонок у PCCS2 із застосуванням поточного регулювання буфера до того, як елюат з трьох колонок у PCCS2 подають на хроматографічну мембрану у PCCS2. Деякі варіанти здійснення додатково включають застосування буферної ємності між PCCS1 і PCCS2. Деякі приклади додатково включають фільтрування елюату з PCCS1 до того, як його подають у PCCS2. Деякі приклади додатково включають фільтрування рідкого середовища для культивування до того, як його подають у MCCS1.

Фармацевтичні композиції й набори

Також в даному документі представлені фармацевтичні композиції, що включають щонайменше один (наприклад, один, два, три або чотири) з рекомбінантних білків α -галактозидази-A людини, представлених в даному документі. Два або більше (наприклад, два, три або чотири) з будь-яких рекомбінантних білків α -галактозидази-A людини, представлених в даному документі, можуть бути присутні в фармацевтичній композиції у будь-якій комбінації. У даному документі також представлені фармацевтичні композиції, які містять, складаються з або складаються фактично з рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого у даному документі, і фармацевтично прийнятного носія.

Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може не мати детектований рівень або не мати білок, ліпід, вуглевод, нуклеїнову кислоту й контамінант (наприклад, будь-який з контамінантів, описаних у даному документі), присутні у продукті тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або продукт крові тварин).

Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може включати білок rhAGA, який продукується у культурі клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи безбілкового, безсироваткового і середовища з визначеним хімічним складом. Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може включати білок rhAGA, представлений у даному документі, який продукується у культурі клітин, у якій використовували тільки безбілкове середовище для культивування та/або середовище для культивування з визначеним хімічним складом. Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може містити білок rhAGA, представлений у даному документі, який продукується культурою клітин, у якій використовували тільки середовища для культивування, вибрані з групи середовищ для культивування: безбілкового, безсироваткового та з визначеним хімічним складом, і який виділяють із застосуванням інтегрованого й безперервного процесу (наприклад, будь-який з інтегрованого й безперервного процесів, описаних у даному документі або в WO 14/137903).

Будь-яка з фармацевтичних композицій, представлених у даному документі, може мати покращений профіль безпеки (наприклад, знижений ризик забруднення (наприклад, будь-який із ілюстративних контамінантів, описаних у даному документі або відомих з рівня техніки), порівняно з фармацевтичною композицією, що містить білок rhAGA (наприклад, будь-який з білків rhAGA, представлених у даному документі), який продукується за допомогою способу, який включає застосування середовища для культивування, що містить продукт тваринного походження (наприклад, сироватка крові тварин, плазма крові тварин або фактор або білок крові тварин).

Фармацевтичні композиції можуть бути складені будь-яким способом, відомим з рівня техніки. Фармацевтичні композиції, представлені в даному документі, є переважними, оскільки вони мають знижений ризик або рівень забруднення (наприклад, знижений ризик або рівень вірусного забруднення) і/або мають знижену гетерогенність у глікоформах, присутніх в композиції.

Фармацевтичні композиції складені так, щоб відповідати призначеному для них шляху введення (наприклад, внутрішньовенному, внутрішньоартеріальному, внутрішньом'язовому, внутрішньошкірному, підшкірному або внутрішньоперитонеальному). Композиція може містити фармацевтично прийнятний носій, наприклад, стерильний розріджувач (наприклад, стерильну воду або сольовий розчин), нелетке масло, поліетиленгліколь, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники, протибактеріальні або протигрибкові засоби, такі як бензиловий спирт або метилпарабени, хлорбутанол, фенол, аскорбінова кислота, тимеросал та подібне, антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або натрію бісульфат, хелатувальні засоби, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота, буфери, такі як ацетати, цитрати або фосфати, та ізотонічні

засоби, такі як цукри (наприклад, декстроза), багатоатомні спирти (наприклад, маніт або сорбіт) або солі (наприклад, натрію хлорид) або будь-яку їх комбінацію. Ліпосомні суспензії також можуть бути застосовані як фармацевтично прийнятні носії (див., наприклад, патент США № 4522811). Препарати з композицій можуть бути складені й поміщені до ампул, одноразових шприців або багатодозових флаконів. При необхідності (наприклад, в ін'єкційних складах), належна плинність може бути підтримана, наприклад, застосуванням покриття, такого як лецитин або поверхнево-активної речовини. Абсорбція рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини може бути пролонгована за допомогою включення засобу, що сповільнює абсорбцію (наприклад, алюмінію моностеарат і желатин). Як альтернатива, контрольоване вивільнення може бути досягнуто за допомогою імплантів і мікроінкапсульованих систем доставлення, які можуть містити біосумісні полімери, що біорозкладаються (наприклад, етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоестери й полімолочна кислота; Alza Corporation і Nova Pharmaceutical, Inc.).

Композиції, що включають один або декілька будь-яких з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, може бути складена для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньоартеріального, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, підшкірного або внутрішньоперитонеального) введення у формі одиниць дозування (тобто фізично дискретних одиниць, що містять попередньо визначену кількість активного білка для полегшення введення й рівномірності дозування).

Токсичність і терапевтична ефективність композицій може бути визначена стандартними фармацевтичними процедурами в культурах клітин або на експериментальних тваринах (наприклад, мавпах). Можна, наприклад, визначити LD_{50} (дозу, летальну для 50% популяції) і ED_{50} (дозу, терапевтично ефективну для 50% популяції): терапевтичний індекс, що являє собою відношення $LD_{50}:ED_{50}$. Засоби, що демонструють високі терапевтичні індекси, є переважними. Якщо засіб демонструє небажаний побічний ефект, слід дотримуватися обережності, щоб звести до мінімуму потенційну небезпеку пошкодження (тобто зменшити небажані побічні ефекти). Токсичність і терапевтична ефективність композицій може бути визначена іншими стандартними фармацевтичними процедурами.

Дані, отримані з аналізів культур клітин і досліджень на тваринах можуть бути застосовані у складанні відповідного дозування будь-якого даного рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, будь-яких рекомбінантних глікопротеїнів, описаних в даному документі) при застосуванні для суб'єкта (наприклад, людини). Терапевтично ефективною кількістю одного або декількох (наприклад, одного, двох, трьох або чотирьох) рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини (наприклад, будь-яких з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі) буде кількість, яка лікує хворобу Фабрі у суб'єкта (наприклад, знижує ризик розвитку або попереджує розвиток хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, суб'єкта-людини, ідентифікованого як такого, що має підвищений ризик розвитку хвороби Фабрі)), знижує тяжкість, частоту й/або тривалість одного або декількох симптомів хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, людини) (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування), знижує накопичені рівні глікосфінголіпідів з кінцевими α -галактозильними залишками, таких як глоботриаозилцерамід, у суб'єкта (наприклад, людини) з хворобою Фабрі (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування)). Ефективність і дозування будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, можуть бути визначені фахівцем з охорони здоров'я або фахівцем з ветеринарії із застосуванням способів, відомих з рівня техніки, а також за допомогою обстеження на предмет одного або декількох симптомів хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, людини). Деякі фактори можуть впливати на дозування і час, необхідні для ефективного лікування суб'єкта (наприклад, тяжкість хвороби або розладу, попереднє лікування, загальний стан здоров'я й/або вік суб'єкта, а також наявність інших хвороб).

Будь-яка з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі, можуть додатково містити один або декілька (наприклад, два, три, чотири або п'ять) додаткових терапевтичних засобів. Необмежувальні приклади додаткових терапевтичних засобів, що можуть бути включені у будь-яку з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі, передбачають протисудомні засоби (наприклад, фенітоїн, карбамазепін, фенобарбітал, метилфенобарбітал, барбексаклон, бензодіазепін, клобозан, клоназепам, клоразепат, діазепам, мідазолам, лоразепам, нітразепам, темазепам, німетазепам, фелбамат, карбамазепін, окскарбазепін, еслікарбазепін ацетат, вігабатрин, прогабід, тіагабін, топірамат, габапентин, прегабалін, етотолін,

фенітоїн, мефенітоїн, фосфенітоїн, параметадіон, триметадіон, етадіон, бекламід, примідон, бриварацетам, леветирацетам, селетрацетам, етосуксимід, фенсуксимід, месуксимід, ацетазоламід, султіам, метазоламід, зонісамід, ламотригін, фенетурид, фенацетамід, валпромід і валноктамід) і протиблювотні засоби (наприклад, метоклопрамід, прохлорперазин, алізаприд, 5 доласетрон, гранісетрон, ондансетрон, тропісетрон, палоносетрон, міртазапін, домперидон, оланзапін, дроперидол, галоперидол, хлорпромазин, прохлорперазин, апрепітант і касопітант).

Типові дози передбачають міліграмові або мікрограмові кількості будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, на кілограм ваги суб'єкта (наприклад, від приблизно 50 мкг/кг до приблизно 3 мг/кг; від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 2,5 мг/кг; від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 2,0 мг/кг; від приблизно 500 мкг/кг до приблизно 1,5 мг/кг; від приблизно 500 мкг/кг до приблизно 1,5 мг/кг або від приблизно 800 мкг/кг до приблизно 1,2 мг/кг). Типові дози також можуть передбачати міліграмові або мікрограмові кількості одного або декількох будь-яких з одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, описаних в даному документі на кілограм ваги суб'єкта (наприклад, від 15 приблизно 1 мкг/кг до приблизно 500 мкг/кг; від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 500 мкг/кг; від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 50 мг/кг; від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 5 мг/кг; від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 0,5 мг/кг або від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 50 мкг/кг для кожного введенного додаткового терапевтичного засобу). Хоча ці дози охоплюють широкий діапазон, фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що терапевтичні засоби, у тому числі 20 рекомбінантний білок α -галактозидази-А і додаткові терапевтичні засоби, описані в даному документі, варіюють за їх ефективністю, та ефективні кількості можуть бути визначені відомими з рівня техніки способами. Як правило, відносно низькі дози вводять спочатку, і медичний працівник або ветеринарний лікар, що лікує (у разі терапевтичного застосування) або дослідник (коли все ще працює над розробкою стадії) може згодом і поступово збільшувати дозу до 25 отримання відповідної відповіді. Крім того, зрозуміло, що конкретний рівень дози для будь-якого конкретного суб'єкта буде залежати від ряду факторів, у тому числі активності конкретної сполуки, що застосовується, віку, ваги тіла, загального стану здоров'я, статі та дієти суб'єкта, часу введення, шляху введення, швидкостей виведення та періоду напіввиведення рекомбінантного глікопротеїну (наприклад, рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини) 30 або додаткових терапевтичних засобів *in vivo*. Фармацевтичні композиції можуть бути поміщені до контейнеру, упаковки або дозатора разом з інструкціями для введення.

Наприклад, один або декілька рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, представлених в даному документі, можуть бути запаковані у стерильний флакон як ліофілізований порошок або таблетка для подальшого відновлення та введення. Ліофілізований 35 порошок або таблетка, що містять рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, можуть містити один або декілька стабілізуювальних засобів (наприклад, один або декілька з маніту, натрію фосфату одноосновного моногідрату та натрію фосфату двоосновного гептагідрату). Приклад ліофілізованого порошку або таблетки, що містять рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, передбачає 37 мг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, 40 222 мг маніту, 20,4 мг натрію фосфату одноосновного моногідрату та 59,2 мг натрію фосфату двоосновного гептагідрату. Перед застосуванням або введенням рекомбінантного білка α -галактозидази людини ліофілізований порошок або таблетку відновлюють введенням 7,2 мл стерильною води для ін'єкції, USP, у флакон, з отриманням розчину 5,0 мг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини на мл. Цей відновлений розчин додатково можна розводити 45 ін'єкцією 0,9% натрію хлориду, USP, до кінцевого об'єму 500 мл, перед внутрішньовенним введенням суб'єкту при дозі приблизно 1 мг/кг. Також передбачаються набори, що включають флакон з ліофілізованою таблеткою або порошком рекомбінантної α -галактозидази людини (як описано в даному параграфі), інструкції для відновлення таблетки або порошку (як описано в даному параграфі) та інструкції для внутрішньовенного введення двічі на тиждень відновленого 50 розчину суб'єкту при дозі приблизно 1,0 мг/кг.

Інший приклад ліофілізованого порошку або таблетки, що містять рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, передбачає 5,5 мг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, 33,0 мг маніту, 3,0 мг натрію фосфату одноосновного моногідрату та 8,8 мг натрію фосфату двоосновного гептагідрату. Перед застосуванням або введенням рекомбінантного білка α -галактозидази людини ліофілізований порошок або таблетку відновлюють введенням 1,1 мл 55 стерильною води для ін'єкції, USP, у флакон, з отриманням розчину 5,0 мг рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини на мл. Цей відновлений розчин додатково можна розводити ін'єкцією 0,9% натрію хлориду, USP, до кінцевого об'єму 500 мл, перед внутрішньовенним введенням суб'єкту при дозі приблизно 1 мг/кг. Також передбачаються набори, що включають 60 флакон з ліофілізованою таблеткою або порошком рекомбінантної α -галактозидази людини (як

описано в даному параграфі), інструкції для відновлення таблетки або порошку (як описано в даному параграфі) та інструкції для внутрішньовенного введення двічі на тиждень відновленого розчину суб'єкту при дозі приблизно 1,0 мг/кг.

Також в даному документі представлені набори, що включають щонайменше одну дозу будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі. За деякими варіантами здійснення набори додатково можуть містити виріб для застосування при введенні фармацевтичної композиції (наприклад, будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі) ссавцю (наприклад, людині) (наприклад, шприц, наприклад, попередньо заповнений шприц). Деякі приклади наборів передбачають одну або декілька доз (наприклад, щонайменше дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, двадцять, тридцять або сорок доз) (наприклад, внутрішньовенних, підшкірних або внутрішньоперитонеальних доз) будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі. У деяких прикладах набір додатково містить інструкції для введення фармацевтичної композиції (або дози фармацевтичної композиції) ссавцю (наприклад, людині з хворобою Фабрі).

За деякими варіантами здійснення набори містять композицію, яка включає щонайменше один з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, та композицію, що містить щонайменше один додатковий терапевтичний засіб (наприклад, будь-яку комбінацію одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, описаних в даному документі). За деякими варіантами здійснення набір додатково містить інструкції для здійснення будь-якого із способів, описаних в даному документі.

Хвороба Фабрі

Хвороба Фабрі являє собою X-пов'язану рецесивну лізосомну хворобу накопичення, яка характеризується дефіцитом α -галактозидази-А, відомої як церамідтригексозидаза, що призводить до судинних та інших проявів хвороби через накопичення глікофінголіпідів з кінцевими α -галактозильними залишками, таких як глоботриаозилцерамід (GL-3). Необмежувальні симптоми хвороби Фабрі передбачають ангідроз, болісні пальці, гіпертрофію лівого шлуночка, ниркові прояви та ішемічні інсульти. Тяжкість симптомів сильно варіює (див., Grewal et al., J. Neurol. 241:153-156, 1994). Визнається варіант з проявами, обмеженими серцем, і його частота може бути більш поширеною, ніж колись вважалося (див. Nakao, N. Eng. J. Med. 333:288-293, 1995). Розпізнавання незвичайних варіантів може бути затримано до достатньо пізнього періоду життя, хоча діагностування у дитинстві можливо при клінічному контролі (Ko et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 120:86-89, 1996; Mendez et al., Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 8:252-257, 1997; Shelley et al., Pediatric Derm. 12:215-219, 1995). Середній вік діагностування хвороби Фабрі складає 29 років.

Способи лікування хвороби Фабрі, що підвищують рівні α -галактозидази у лізосомі клітини ссавця та знижують рівні глоботриаозилцераміду у суб'єкта

Також в даному документі представлені способи лікування хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, людини), що передбачає введення суб'єкту композиції, що містить терапевтично ефективну кількість щонайменше одного з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини або фармацевтичних композицій, описаних в даному документі. Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини, описані в даному документі, опосередковують лікування хвороби Фабрі шляхом підвищення концентрації α -галактозидази-А у лізосомі в клітині ссавця у суб'єкта. Успішне лікування хвороби Фабрі у суб'єкта може бути визначено фахівцем охорони здоров'я (наприклад, медсестрою, терапевтом або асистентом терапевта). Наприклад, успішне лікування може давати зниження числа, тяжкості та/або частоти одного або декількох симптомів хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, ангідрозу, болісних пальців, гіпертрофії лівого шлуночка, ниркових проявів, ішемічних інсультів і підвищених рівнів глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта) (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування). Крім того, успішне лікування може бути визначено шляхом спостереження зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові або в тканині (наприклад, нирці) суб'єкта в залежності від часу (наприклад, у порівнянні з суб'єктом з хворобою Фабрі, що отримує інше лікування, отримує плацебо або не отримує лікування, або у порівнянні з тим самим суб'єктом до лікування). Додаткові способи визначення успішного лікування хвороби Фабрі у суб'єкта описані в даному документі та відомі з рівня техніки.

Також представлені способи підвищення рівнів білка α -галактозидази-А у лізосомі в клітині ссавця (наприклад, в клітині *in vitro* або клітині у ссавця, такого як людина), що передбачають введення у контакт клітини щонайменше з одним з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, або щонайменше з однією з фармацевтичних

композицій, описаних в даному документі, у кількості, достатній для підвищення рівнів білка α -галактозидази-A у лізосомі в клітині. Клітиною ссавця може бути клітина, що експресує манозо-6-фосфатний рецептор. Рівні α -галактозидази-A у лізосомі клітини ссавця можуть бути визначені із застосуванням імуофлуоресцентної мікроскопії при використанні антитіла, яке специфічно зв'язується з білком α -галактозидази людини-A. Рівні білка α -галактозидази-A у лізосомі клітини ссавця також можуть бути визначені шляхом виділення лізосом з клітини ссавця та визначення рівнів білка α -галактозидази-A в виділених лізосомах, наприклад, через застосування антитіла, яке специфічно зв'язується з білком α -галактозидази-A, або шляхом здійснення аналізу активності білка α -галактозидази-A із застосуванням лізату з виділених лізосом. Прикладом аналізу білка α -галактозидази-A є аналіз, при якому застосовують О-нітрофеніл- α -D-галактозид як субстрат. В цьому аналізі О-нітрофеніл- α -D-галактозид перетворюється на продукти О-нітрофенол і D-галактозу. В іншому прикладі аналізу для виявлення активності білка α -галактозидази-A застосовують флуорогенний субстрат, α -D-галактопіранозид (Shi et al., Anal. Bioanal. Chem. 394:1903-1909, 2009). Підвищення рівня білка α -галактозидази-A в лізосомі клітини у суб'єкта (наприклад, людини) може бути опосередковано виявлено спостереженням зниження числа симптомів хвороби Фабрі, що відчуває суб'єкт (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування), зниження швидкості прояву нових симптомів хвороби Фабрі, що відчуває суб'єкт (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування), зниження тяжкості одного або декількох симптомів хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування) або зниження погіршення одного або декількох симптомів хвороби Фабрі у суб'єкта (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування). Як альтернатива або додатково, підвищення рівня білка α -галактозидази-A у лізосомі клітини, наприклад, може бути виявлено спостереженням зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта (наприклад, у порівнянні з контрольним суб'єктом, що страждає на ту саму хворобу, але, наприклад, не отримує лікування, отримує інше лікування або отримує плацебо, або є тим самим суб'єктом до лікування). Рівень білка α -галактозидази-A у лізосомі в клітині ссавця після лікування рекомбінантним білком, описаним в даному документі, можна порівнювати з рівнем α -галактозидази-A у лізосомі клітини ссавця без лікування (наприклад, клітини того самого типу).

Також представлені способи зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові або в тканинах (наприклад, в нирці) суб'єкта (наприклад, людини), що передбачає введення щонайменше одного з рекомбінантних білків α -галактозидази-A людини або щонайменше однієї з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі, суб'єкту. Рівень глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта може бути визначений, наприклад, із застосуванням мас-спектрометрії (Kim et al., Korean J. Intern. Med. 25:415-421, 2010) або сендвіч-аналізом з антитілом (наприклад, аналізами, описаними в публікації заявки на патент США № 2012/0178105). Рівень глоботриаозилцераміду в сироватці крові або тканині суб'єкта після введення щонайменше одного рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини або фармацевтичної композиції, представленої в даному документі, можна порівнювати з рівнем глоботриаозилцераміду в сироватці крові або тканині суб'єкта з хворобою Фабрі, що не отримує лікування або отримує інше лікування, або з рівнем глоботриаозилцераміду у суб'єкта до введення щонайменше одного рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини або фармацевтичної композиції, представленої в даному документі.

За деякими варіантами здійснення у суб'єкта (наприклад, людини) раніше була діагностована хвороба Фабрі або підозрюється хвороба Фабрі. За деякими варіантами здійснення ссавець був ідентифікований як такий, що має підвищений ризик розвитку хвороби Фабрі (наприклад, підвищений генетичний ризик розвитку хвороби Фабрі). Ссавцем може бути жінка або чоловік і може бути дорослий або дитина (наприклад, немовля або дошкільник). В деяких випадках суб'єктом є людина. Коли ссавцем є дитина, він або вона може мати вік від 1 дня до 18 років, включно (наприклад, від 1 дня до 17 років, від 1 дня до 16 років, від 1 дня до 15 років, від 1 дня до 14 років, від 1 дня до 13 років, від 1 дня до 12 років, від 1 дня до 11 років, від 1 дня до 10 років, від 1 дня до 9 років, від 1 дня до 8 років, від 1 дня до 7 років, від 1 дня до 6 років, від 1 дня до 5 років, від 1 дня до 4 років, від 1 дня до 3 років, від 1 дня до 2 років, від 1 дня до 1 року, від 1 дня до 6 місяців, від 6 місяців до 4 років, від 1 місяця до 5 років, від 3 років до 13

років або від 13 років до 18 років). Коли ссавцем є дорослий, ссавець може мати вік, наприклад, від 18 до 20 років, включно, або щонайменше або приблизно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або щонайменше або приблизно 100 років.

У суб'єкта може бути діагностована хвороба Фабрі фахівцем охорони здоров'я шляхом спостереження одного або декількох симптомів у суб'єкта (наприклад, одного або декількох будь-яких з симптомів хвороби Фабрі, описаних в даному документі або відомих з рівня техніки). У деяких прикладах суб'єкт уже може отримувати лікування від хвороби Фабрі. В інших випадках попереднє лікування хвороби Фабрі не було успішним.

Рекомбінантні білки або фармацевтичні композиції, описані в даному документі, можуть біти введені внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, підшкірним, внутрішньоперитонеальним, інтрелімфатичним, внутрішньом'язовим, очним або інтратекальним введенням. Крім того, рекомбінантні білки та фармацевтичні композиції можуть бути складені із застосуванням будь-яких відомих з рівня техніки методик, і/або як описано в даному документі (наприклад, складені для підшкірного, внутрішньовенного, внутрішньоартеріального, інтерлімфатичного, внутрішньом'язового, білям'язового або інтратекального введення і/або складені у ліпосомі або наночастинці).

Рекомбінантні білки α -галактозидази-А людини або фармацевтичні композиції, описані в даному документі, можуть бути введені медиком (наприклад, терапевтом, асистентом терапевта, медсестрою, асистентом медсестри або лаборантом) або фахівцем з ветеринарії. Як альтернатива або додатково, рекомбінантний білок або фармацевтична композиція можуть бути самостійно введені людиною, наприклад, пацієнтом/пацієнткою. Введення може відбуватися, наприклад, у лікарні, клініці або пункті першої допомоги (наприклад, у центрі сестринського догляду), або у будь-якій їх комбінації.

За деякими варіантами здійснення ссавцю вводять дозу від 1 мг до 400 мг будь-якого з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини, описаних в даному документі, або будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних в даному документі (наприклад, від 1 мг до 300 мг, від 1 мг до 250 мг, від 1 мг до 200 мг, від 1 мг до 150 мг, від 1 мг до 100 мг, від 1 мг до 80 мг, від 1 мг до 70 мг, від 1 мг до 60 мг, від 1 мг до 50 мг, від 1 мг до 40 мг, від 1 мг до 30 мг, від 1 мг до 20 мг, від 1 мг до 10 мг, від 20 мг до 120 мг, від 30 мг до 90 мг або від 40 мг до 80 мг). У деяких прикладах суб'єкту вводять дозу рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 4,0 мг/кг (наприклад, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 3,5 мг/кг, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 3,0 мг/кг, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 2,5 мг/кг, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 2,0 мг/кг, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 1,5 мг/кг, від приблизно 0,5 мг/кг до приблизно 1,5 мг/кг або від приблизно 0,7 мг/кг до приблизно 1,3 мг/кг).

За деякими варіантами здійснення суб'єкту додатково вводять додатковий терапевтичний засіб (наприклад, будь-який з додаткових терапевтичних засобів, описаних в даному документі). Додатковий терапевтичний засіб може бути введений суб'єкту практично одночасно з рекомбінантним білком або фармацевтичною композицією, або може бути введений в одну або декілька інших точок часу. За деякими варіантами здійснення додатковий терапевтичний засіб складають разом щонайменше з одним рекомбінантним білком α -галактозидази-А людини (наприклад, із застосуванням будь-якого з прикладів складів і композицій, описаних в даному документі).

За деякими варіантами здійснення додатковий терапевтичний засіб складають у першу дозовану форму, а щонайменше один рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини складають у другу дозовану форму. Якщо додатковий терапевтичний засіб складають у першу дозовану форму, і щонайменше один рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини складають у другу дозовану форму, то перша дозована форма та друга дозована форма можуть бути складені, наприклад, для однакового шляху введення (наприклад, перорального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, інтратекального, інтрартеріального, інтерлімфатичного або внутрішньоперитонеального введення) або для різних шляхів введення (наприклад, перша дозована форма складена для перорального введення, а друга дозована форма складена для підшкірного, внутрішньовенного, внутрішньоартеріального або внутрішньом'язового введення). Комбінації таких режимів лікування чітко передбачаються даним винаходом.

Як описано вище, кількість щонайменше одного введеного рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини (та необов'язково додаткового терапевтичного засобу) буде залежати від того, є введення локальним (наприклад, внутрішньом'язовим) чи системним. За деякими варіантами здійснення суб'єкту (наприклад, людині) вводять не більш ніж одну дозу щонайменше одного рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини або щонайменше однієї

фармацевтичної композиції. За деякими варіантами здійснення суб'єкту (наприклад, людині) вводять більш ніж одну дозу (наприклад, дві або більше доз) будь-якої з композицій, описаних в даному документі. За деякими варіантами здійснення суб'єкту вводять дозу щонайменше одного рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини або щонайменше однієї фармацевтичної композиції щонайменше один раз на місяць (наприклад, щонайменше двічі на місяць, щонайменше три рази на місяць, щонайменше чотири рази місяць, щонайменше один раз на тиждень, щонайменше двічі на тиждень, три рази на тиждень, один раз в день або двічі на день). Наприклад, суб'єкту можуть бути введені дві або більше доз будь-якої з фармацевтичних композицій або один або декілька з рекомбінантних білків α -галактозидази-А людини з частотою щонайменше одна доза кожні два місяці (наприклад, щонайменше одна доза кожний місяць, щонайменше одна доза на тиждень, щонайменше одна доза кожні два тижні або щонайменше одна доза на день).

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини або фармацевтична композиція можуть вводитися суб'єкту хронічно. Хронічні види лікування передбачають будь-яку форму повторного введення протягом тривалого періоду часу, таку як повторні введення протягом одного або декількох місяців, від місяця до року, одного або декількох років, більше п'яти років, більше 10 років, більше 15 років, більше 20 років, більше 25 років, більше 30 років, більше 35 років, більше 40 років, більше 45 років або довше. Як альтернатива або додатково, можуть здійснюватися хронічні види лікування. Хронічні види лікування можуть передбачати регулярні введення, наприклад один або декілька разів на день, один або декілька разів на тиждень або один або декілька разів на місяць. Наприклад, хронічне лікування може містити введення (наприклад, внутрішньовенне введення) приблизно кожні два тижні (наприклад, приблизно кожні 10-18 днів). Придатною дозою може бути кількість рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, яка є самою низькою дозою, ефективною для створення бажаного терапевтичного ефекту. Така ефективна доза звичайно буде залежати від факторів, описаних в даному документі. Якщо бажано, ефективна щоденна доза рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини або фармацевтичної композиції може бути введена у вигляді двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести або більше піддоз, що вводяться окремо з відповідними інтервалами протягом дня, необов'язково, в одиничних дозованих формах.

Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини або фармацевтична композиція може бути складені для пролонгованого вивільнення (наприклад, складені у полімер, що біорозкладається, або наночастинку), і в деяких випадках можуть бути введені безпосередньо у м'язову тканину, підшкірну тканину або перитонеальну порожнину суб'єкту (внутрішньом'язовим, внутрішньоперитонеальним або введенням у вигляді підшкірного депо, відповідно). Як альтернатива або додатково, склад пролонгованого вивільнення може вводитися системно (наприклад, пероральним, внутрішньовенним, інтраартеріальним, внутрішньоперитонеальним, інтерлімфатичним або підшкірним введенням). В деяких випадках рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини або фармацевтична композиція можуть бути складені для перорального, внутрішньозалозистого, біязалозистого, підшкірного, внутрішньопотокового, внутрішньом'язового, білям'язового, внутрішньоперитонеального, внутрішньом'язового, внутрішньоартеріального, трансдермального, інтерлімфатичного або внутрішньовенного введення.

Приклади

Даний винахід далі описується в наступних прикладах, які не обмежують об'єм даного винаходу, описаний формулою винаходу.

Приклад 1. Отримання лінії рекомбінантних клітин для продукування глікопротеїнів

Експерименти здійснювали для розробки лінії клітин, застосовної для рекомбінантного продукування глікопротеїнів. В цих експериментах початкову залежну від сироватки крові лінію клітин CHO (DXB11) періодично вирощували в середовищі для культивування тканин, що включало 5% фетальної бичачої сироватки крові, протягом трьох днів, вирощували в середовищі для культивування тканин, що включало 2,5% фетальної бичачої сироватки крові, протягом трьох днів, і вирощували в середовищі для культивування тканин, що не включало фетальну бичачу сироватку крові, протягом восьми днів. Наприкінці цього періоду культивування отриману культуру клітин CHO розбавляли та аліквотували для створення безсироваткової підпопуляції або пулу суспензійних культур. Після нарощування та оцінювання росту безсироваткової пули аліквотували для створення культур одноклітинного клону. Кожний одноклітинний клон тестували за його клітинним ростом у безсироватковому середовищі для культивування та потім підгрупу клонів тестували за ефективністю трансфекції шляхом електропорації вектора експресії, що кодує червоний флуоресцентний білок (RFP) під контролем промотора β -актину хом'яка, з аналізом експресії RFP за допомогою протокової

цитометрії через 2 дні після трансфекції. Клонів, що відповідали критеріям протягом часу подвоєння (< 35 годин) та ефективності трансфекції (> 30% позитивний RFP з > 75% життєздатністю культури), оцінювали за рекомбінантною експресією білка після стабільної трансфекції вектором(ми) експресії, що кодує ген(и) інтересу під контролем промотора β-актину хом'яка й що кодує ген DHFR під контролем промотора SV40. Після трансфекції стабільно трансфеговані пули відбирали із застосуванням метотрексату (MTX), а після відбору пули оцінювали за продуктивністю рекомбінантного білка за допомогою висівання клітин у культури без підживлення та аналізу зібраного проясненого середовища на предмет рівнів рекомбінантного білка. На основі відбору за допомогою MTX тих, що вижили, та рівнів продукування рекомбінантного білка в стабільно трансфегованих пулах ідентифікували головний безсироватковий батьківський клон.

Головний батьківський клон субклонували й далі культивували у безбілковому з компонентом тваринного походження без (ADC) і середовищі з визначеним хімічним складом(середовищі CD DG44 від Invitrogen) та субклони збирали у банк. Близько 27 поколінь клітин в без ADC середовищі проходило від стадії отримання одноклітинного субклону до вихідного банку заморожених клітин. Одноклітинні клони тестували на наступний предмет: ефективність трансфекції (за допомогою електропорації з вектором, що кодує RFP, описаним вище), ростові властивості клітин (в середовищі CD DG44 від Invitrogen) та стабільні трансформації для продукування рекомбінантних білків. Оцінювання стабільно трансфегованих пулів (із застосуванням середовища CD CHO від Invitrogen) передбачало оцінки відбору за допомогою MTX, пікову щільність клітин, ростові властивості та об'ємну продуктивність (VPR). Продуктивність рекомбінантного білка тестували, як описано вище.

Одноклональну батьківську лінію клітин після всіх стадій культивування, описаних вище, ідентифікували як таку, що має найкращу ефективність трансфекції та найкращий відбір за допомогою MTX, пікові щільності клітин, ростові властивості клітин і об'ємну продуктивність (VPR) стабільно трансфегованих пулів. Цю батьківську лінію клітин нарощували й заморожували в аліквотах для застосування в наступних експериментах.

Приклад 2. Продукування рекомбінантної α-галактозидази-А людини

Флакон клітин, що продукують (і секретують) рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини, розтоплювали у визначеному за хімічним складом і без компонента тваринного походження (ADC) середовищі для культур клітин в струшувальних колбах. Суміш нарощували до достатньої кількості клітин, доступної для засівання перфузійних біореакторів. Забезпечували ріст культури до досягнення цільової високої щільності життєздатних клітин, при якій ініціювали точковий контроль щільності клітин. Безперервну перфузію розпочинали через один день після інокуляції, а потім покроково підвищували до фіксованої швидкості перфузії при цільовій високій щільності клітин у перфузійному біореакторі. Прояснену зібрану рідину (що містить рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини) безпосередньо завантажували у захоплювальну колонку із застосуванням інтегрованої безперервної системи захоплювальної хроматографії. Потім захоплений елюат (що містить рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини) додатково очищували аніон-обмінною хроматографічною смолою (ANX) для вилучення ДНК, білка клітини-хазяїна та інших домішок. Елюат з ANX (що містить рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини) додатково очищували крізь смолу афінної хроматографії на імобілізованих іонах металу. Елюат афінної хроматографії на імобілізованих іонах металу (що містить рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини) концентрували до цільової концентрації рекомбінантного білка α- галактозидази-А людини, а потім буфер міняли на буфер з лікарською речовиною із застосуванням мембрани для фільтрації в тангенціальному потоці. Потім лікарську дослідженню (як описано в прикладах). Потім для РК/РД дослідження (приклад 5) препарат лікарської речовини рекомбінантного білка α-галактозидази-А людини складали за допомогою додавання маніту, а потім фільтрували крізь абсолютний фільтр 0,22 см².

Приклад 3. Фізичне дослідження рекомбінантної α-галактозидази-А людини

Рекомбінантний білок α-галактозидази-А людини, отриманий та очищений у прикладі 2, фізично досліджували із застосуванням ряду біофізичних методик і порівнювали з Fabrazyme® та Replagal®. Кожна з досліджуваних структурних і функціональних ознак рекомбінантного білка α-галактозидази-А людини обговорюється нижче, разом із способами, застосованими для визначення кожної структурної та функціональної ознаки.

Молекулярний розмір

Молекулярний розмір Fabrazyme®, Replagal® і рекомбінантного білка α- галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), оцінювали із застосуванням ексклюзійної хроматографії, MALDI-TOF MS та електрофорезу у гелі.

SEC

Аналіз ексклюзійної хроматографії (SEC) здійснювали за допомогою HPLC Agilent 1200 із застосуванням колонки TSK-Gel G3000SWXL (Tosoh, 7,8 мм×30 см). Вводили п'ятдесят мкл зразка і здійснювали колонкову хроматографію при швидкості потоку 0,5 мл/хвилина. Елюйовані білки виявляли при 280 нм.

5 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS здійснювали за допомогою першого розведення зразків (1:5) у 0,1% водній мурашиній кислоті. BSA розбавляли до 2 мг/мл у 0,1% водній мурашиній кислоті. Розведені зразки наносили у трьох повторностях на підкладку з нержавіючої сталі MALDI з насиченою синапіною кислотою у водній 0,1% TFA, 50% ацетонітрилі з відношенням 1 мкл/1 мкл. Створювали десять спектрів для кожного нанесення на різних ділянках та з варіювальною інтенсивністю лазера, а потім усереднювали. Параметри налаштування приведені в таблиці 1. Спектри калібрували до одно- та двохзарядних піків маса/заряд BSA. Необроблені дані вирівнювали із застосуванням режиму стандартного вирівнювання при піковому розрішенні 200. Пікові значення з вимірювання у трьох повторностях усереднювали та визначали стандартне відхилення.

Таблиця 1

Параметри налаштування для MALDI-MS аналізу Fabrazyme

Параметр	Значення
Режим іонізації	лінійний, позитивний
Контрольний режим	Ручний
Прискорювальна напруга	25000 В
Напруга на сітці	88%
Час витримки	750 нсек
Імпульси/спектр	30
Діапазон мас	19999-90000
Ворота низької маси	2000

SDS-PAGE

Десять мкг кожного зразка завантажували в 4-20% трис-гліциновий гель (Invitrogen) у буфері для завантажування зразка з дитіотреїтолом (DTT). Напругу 150 подавали на гель протягом 1 часу та 25 хвилин. По завершенні гель фарбували розчином для фарбування Coomassie R-250 протягом 30 хвилин. Надмірну фарбу видаляли із застосуванням знебарвлювального розчину протягом 30 хвилин.

Результати

Аналіз ексклюзійної хроматографії (SEC) показує, що Fabrazyme® елюється раніше та з витягненими виступами у порівнянні з Replagal® (фігура 6). Ці результати підтверджують, що Fabrazyme® є гетерогенним і може мати більш високу молекулярну масу у порівнянні з Replagal®. Спектри MALDI-TOF MS на фігурах 7A-7B показують, що відношення маса/заряд головних частинок, що спостерігали для Fabrazyme® та Replagal®, є порівняним. Fabrazyme® також містить частинки з більш низькою молекулярною масою рекомбінантної α -галактозидази-А людини, які не спостерігали у Replagal®. Спектри MALDI-TOF MS на фігурі 8 показують, що відношення маса/заряд головних частинок, що спостерігали для Fabrazyme® і FZ2G, є порівняним. Fabrazyme® містить частинки з більш низькою молекулярною масою, які не спостерігали для FZ2G у спектрі MALDI-TOF MS. Рухомість у SDS-PAGE Fabrazyme® і Replagal® є порівняною. Незначну кількість частинок з більш високою рухомістю (з більш низькою середньою молекулярною масою) спостерігали в Fabrazyme®, але не в Replagal® (фігура 9).

Профіль глікозилювання

Профілі N-зв'язаного глікозилювання для Fabrazyme®, Replagal® і FZ2G визначали із застосуванням дериватизування 2-антраніловою кислотою (AA) і рідинної хроматографії з нормальними фазами із виявленням флуоресценції, як в цілому описано в Kamoda et al., J. Chromatography A 1133:332-339, 2006).

Аналіз сайт-специфічних гліканів

Аналіз сайт-специфічного глікозилювання Fabrazyme®, Replagal® і FZ2G здійснювали із застосуванням гібридного лінійного іонного мас-спектрометра з уловлювачем Orbitrap (LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific), приєднаним до системи рідинної хроматографії (nanoAcquity LC, Waters). В цій процедурі ферментативне розщеплення здійснювали першим зменшенням

100 мкг білка з дитіотреїтолом з наступним алкілюванням йодооцтовою кислотою. Потім зразки заміняли на трис-Cl, pH 8,0, із застосуванням колонок Biospin30 (Bio-Rad) з наступним 18-годинним розщепленням ендопроїтеїназою Lys-C та 2-годинним розщепленням трипсином. Після розрідження мурашиною кислотою для гасіння розщеплення вводили 200 нг кожного зразка у колонку 75 мкм x 10 см C-18 (Picoфrit, New Objectives). Пептиди елюювали у поступовому градієнті 2-95% ацетонітрилу в 0,1% мурашиній кислоті. Сканували діапазон маса/заряд від 325 до 1800 за допомогою FTMS при розділенні 60000 із залежними від даних CID-скануваннями з 5 найбільш високим показниками інтенсивності. Дані MS інтегрували та обробляли із застосуванням програмного забезпечення RefinerMS V 7,6 (Genedata) для кількісної оцінки й збирали CID спектри для підтвердження композиції глікоформ.

Результати

На фігурі 10 показана типова хроматограма AA-дериватизованих N-зв'язаних олігосахаридів Fabrazyme®, що демонструє специфічний тип N-зв'язаного олігосахариду, присутнього в кожному з піків. Ідентичності гліканових частинок, що спостерігалися у профілях AA-міченого глікану, визначали аналізом LCMS. Хроматограми, що демонструють елювання різних типів AA-дериватизованих N- зв'язаних олігосахаридів в Fabrazyme® і Replagal®, показані на фігурі 11. Відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що відповідають кожному типу N-зв'язаного олігосахариду для Fabrazyme® і Replagal®, показані на фігурі 12. Відносний відсотковий вміст кожних гліканових частинок, що спостерігали при Asn108, Asn161 і Asn184 для Fabrazyme® і Replagal®, показані на фігурах 13, 14 та 15, відповідно. Відносний відсотковий вміст кожних гліканових частинок, що спостерігали при Asn108, Asn161 і Asn184 для Fabrazyme® і FZ2G, показані на фігурах 16 та 17, 18 та 19, відповідно.

AA-мічені профілі Fabrazyme® і FZ2G показані на фігурі 20. Відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що відповідають нейтрально зарядженим олігосахаридам (пік 1), моносіалільованим фукозо-вмісним олігосахаридам (пік 2) і моносіалільованим олігосахаридам (пік 3) у Fabrazyme® і FZ2G, показані на фігурах 21A-C. Відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що відповідають бісіалільованим фукозо-вмісним олігосахаридам (пік 4), бісіалільованим олігосахаридам (пік 5) і трьохрозгалуженим трисіалільованим олігосахаридам форми 1 (пік 6) у Fabrazyme® та у FZ2G, показані на фігурах 22A-C. Відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що відповідають трьохрозгалуженим трисіалільованим олігосахаридам форми 2 (пік 6'), манозо-6-фосфат-вмісним олігосахаридам (пік 7) і монофосфорильованим олігосахаридам (пік 8) у Fabrazyme® та у FZ2G, показані на фігурах 23A-C. Відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що відповідають тетрасіалільованим олігосахаридам (пік 9), моносіалільованим або монофосфорильованим олігосахаридам (пік 10) та біс-манозо-6-фосфат-вмісним олігосахаридам (пік 11) у Fabrazyme® та у FZ2G, показані на фігурах 24A-C.

Ці дані показують, що представлений в даному винаході рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини (FZ2G) має практично інший патерн глікозилювання у порівнянні з Fabrazyme®. Наприклад, рекомбінантні білки α - галактозидази-A людини, представлені в даному документі (FZ2G), мають відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди (пік 1), який менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозо-вмісні олігосахариди (пік 2), який менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 7), який приблизно такий самий або менше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфорильовані олігосахариди (пік 8), який більше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалільовані олігосахариди (пік 9), який більше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані та монофосфорильовані (пік 10), який більше ніж в Fabrazyme®; відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфат-вмісні олігосахариди (пік 11), який більше ніж в Fabrazyme®. Змінений патерн глікозилювання рекомбінантних білків α -галактозидази-A людини, описаних в даному документі (FZ2G) (наприклад, у порівнянні з Fabrazyme®), забезпечує кілька переваг, наприклад, одне або декілька із зниження неспецифічного націлювання рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини на печінку (шляхом зниженого зв'язування з асіалоглікопротеїновим рецептором, експресованим на поверхні гепатоцитів, після введення рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини суб'єкту, наприклад, суб'єкту-людині), підвищеної швидкості ендцитозу рекомбінантного білка α -галактозидази людини клітиною ссавця (наприклад, клітиною людини), що експресує білок-рецептор манозо-6-фосфату на своїй поверхні, підвищеної афінності до білка- рецептора

манозо-6-фосфату та підвищеного період напіввиведення з сироватки крові, у порівнянні з Fabrazyme®.

Відношення манозо-6-фосфату й N-ацетилнейрамінової кислоти до білка

Додатковий ряд експериментів здійснювали для визначення молярного відношення манозо-6-фосфату до білка й молярного відношення N- ацетилнейрамінової кислоти до білка в рекомбінантному білку α -галактозидази-A людини, представленому в даному документі (FZ2G), і в Fabrazyme®.

Дані демонструють, що рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), має молярне відношення манозо-6- фосфату до білка, що є приблизно таким самим, що і в Fabrazyme®, і підвищене молярне відношення N-ацетилнейрамінової кислоти до білка у порівнянні з Fabrazyme® (фігури 25A-B).

Ізоелектрична точка

Капілярне ізоелектричне фокусування з детекцією безпосередньо у капілярі (icIEF) застосовували для оцінювання заряду білка для кожного тестованого білка. Електроферограма для Fabrazyme® і Replagal® показана на фігурі 31. Відносні відсоткові відношення діапазонів низьких, середніх та високих pI електроферограми визначили для рекомбінантного білка α -галактозидази-A, представленого в даному документі (FZ2G), та Fabrazyme® і представили на фігурах 32A-C.

Зворотно-фазова хроматографія

В іншому ряді експериментів аналізували Fabrazyme® і Replagal® із застосуванням зворотно-фазової високо ефективної рідинної хроматографії (RP- HPLC). Зразки вводили в колонку YMC Octyl (Waters, 2,0×100 мм) та елюювали із застосуванням лінійного градієнта TFA/ацетонітрил при швидкості потоку 0,25 мл/хвилина. Елюювані білки виявляли при 215 нм. Аналізи здійснювали із застосуванням HPLC Agilent 1200.

Дані демонструють, що Replagal® елюється з колонки RP-HPLC у ранішу точку часу, ніж Fabrazyme® (фігура 35).

Приклад 4. Функціональне дослідження рекомбінантної α -галактозидази-A людини

Активність зв'язування з катіон-незалежним манозо-6-фосфатним рецептором

Ряд експериментів Biacore здійснювали для тестування здатності рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі, Fabrazyme® і Replagal® до зв'язування з катіон-незалежним манозо-6-фосфатним рецептором (CIMPR).

Сенсограми Biacore для Fabrazyme® і Replagal® показані на фігурі 26. Криві зв'язування цих сенсограм для Fabrazyme® і Replagal® показані на фігурі 27. Графік, що коротко представляє активність CIMPR-зв'язування для рекомбінантного білка α - галактозидази-A, представленого в даному документі (FZ2G), і Fabrazyme®, показаний на фігурі 28. Порівняння цих даних показує, що рекомбінантний білок α - галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), має підвищену активність CIMPR-зв'язування у порівнянні з Fabrazyme®.

Здатність рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), Fabrazyme® і Replagal® до зв'язування з манозо-6-фосфат рецептор також тестували із застосуванням афінної колонкової хроматографії. Колонки з манозо-6-фосфатним рецептором поступово елюювали з манозо-6-фосфатом і відсотковий вміст загального завантаженого рекомбінантного білка, що елюювався з колонки, в кожній фракції елюювання показано на фігурах 29 і 30). Дані указують на те, що рекомбінантний білок α -галактозидази-A, представлений в даному документі (FZ2G), має нижчий відносний відсотковий вміст незв'язаного та більш високий відсотковий вміст високоафінних частинок у порівнянні з Fabrazyme® і Replagal®.

K_m і V_{max}

Також визначали K_m і V_{max} рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі (FZ2G), і Fabrazyme®.

Дані демонструють, що рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), має знижений або приблизно такий самий K_m у порівнянні з Fabrazyme® (фігура 33) і має приблизно такий саме або трохи знижений V_{max} у порівнянні з Fabrazyme® (фігура 34).

В цілому, дані, представлені в даному документі, демонструють, що рекомбінантний білок α -галактозидази-A людини, представлений в даному документі (FZ2G), має змінений патерн глікозилювання та поліпшену активність зв'язування з манозо-6-фосфатним рецептором у порівнянні з Fabrazyme®.

Приклад 5. Дослідження на тваринах

Два дослідження на тваринних моделях здійснювали для оцінювання ефекту рекомбінантного білка α -галактозидази-A людини, представленого в даному документі, на

кліренс і фармакокінетичні параметри GL-3.

Перше дослідження проводили для вивчення ефектів рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини (у порівнянні з Fabrazyme®) на тканинний кліренс GL-3 після одноразового внутрішньовенного (IV) введення при 0,1 мг/кг і 1 мг/кг мишам Fabry. В даному дослідженні 90 мишей Fabry (46M/44F) розподіляли на 5 груп (див. таблицю 2, нижче). Тваринам групи 1 (n=10, 6M/4F) одноразово IV вводили носій. Тваринам груп 2 і 3 (n=20 на групу, 10M/10F) одноразово IV вводили Fabrazyme® при 0,1 мг/кг і 1,0 мг/кг, відповідно. Тваринам груп 4 і 5 (n=20 на групу, 10M/10F) одноразово IV вводили рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), при 0,1 мг/кг і 1,0 мг/кг, відповідно. Тварини дикого типу групи 6 (n=1M) не отримували лікування та служили контролем для калібрування GL-3. Тварин піддавали евтаназії через 3 дні після введення дози (групи 2-5, n=10, 5M/5F на групу) і через 14 днів після введення дози (група 1 і групи 2-5, n=10, 5M/5F на групу). Аналіз GL-3 проводили на наступних тканинах: серце й нирка (групи 1, 3 і 5) та селезінка і печінка (групи 1, 2 та 4).

Таблиця 2

Схема дослідження кліренсу GL-3

Група	Лінія миші	# тварин (Ч/Ж)	Дослідний зразок	Доза (мг/кг)	Режим дозування/Шл ях введення	Зразок крові Точка часу та Аналіз	Зразок тканини Точка часу та Аналіз
1	Fabry	(10) 6/4	Носій	-	Одноразова доза/IV	День 2 (Групи 2-5, n=10, 5Ч/5Ж на групу) для Lyso GL-3 аналізу День 13 (групи 1,6, і групи 2-5, n=10, 5Ч/5Ж на групу) для Lyso GL-3 аналізу	День 3 (Групи 2-5, n=10, 5Ч/5Ж на групу) для GL- 3 і Lyso GL-3 аналізу День 14 (групи 1,6, і групи 2-5, n=10, 5Ч/5Ж на групу) для GL-3 і Lyso GL-3 аналізу
2		(20) 10/10	Fabrazyme®	0,1			
3		(20) 10/10	Fabrazyme®	1,0			
4		(20) 10/10	Fz2G	0,1			
5		(20) 10 / 10	Fz2G	1,0			
6	SV129	1 (1/0)	н.д.				

Короткий опис деяких з функціональних і структурних характеристик рекомбінантного білка α -галактозидази-А, представленого в даному документі (FZ2G), який вводили мишам Fabry у дослідженнях на тваринах у цьому прикладі, представлений в таблиці 3, нижче.

Дані, демонструють, що досягається подібне зниження накопичення GL-3 в печінці, селезінці, серці та нирці мишачій моделі хвороби Фабрі після внутрішньовенного введення одноразової дози Fabrazyme® або одноразової дози рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G) (див. фігури 36, 37, 38 і 39, відповідно). В цілому, дані демонструють, що немає статистично значущої різниці у кліренсі GL-3 на мишачій моделі хвороби Фабрі після одноразової внутрішньовенно введеної дози Fabrazyme® або одноразової внутрішньовенно введеної дози рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G).

Таблиця 3

Ряд фізичних та структурних характеристик FZ2G,
що застосовували в дослідженнях на тваринах

	Fabrazyme®	FZ2G
Зв'язування з M6Pr (%)	100	130
icIEF		
Піки 1-5 (%)	51,3*	60,4
Піки 6-11 (%)	36,8*	28,9
Піки 12-14 (%)	11,9*	10,7
MALDI-TOF MS (маса/заряд)	50,828	50,743
Вміст M6P (моль/моль)	1,7	2,0
Вміст сілової кислоти (моль/моль)	2,8	3,1

- Друге дослідження виконували для характеристики й порівняння фармакокінетичних параметрів Fabrazyme® і рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого в даному документі (FZ2G), на мишах Fabry після одноразового введення 1 мг/кг (IV). В даному дослідженні 20 мишей Fabry (12M/8F) розподіляли на 2 групи (див. таблицю 4, нижче). Тваринам груп 1 і 2 (n=10 на групу, 6M/4F) одноразово IV вводили Fabrazyme® та рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини, представлений в даному документі (FZ2G), при 1,0 мг/кг, відповідно. Збирали зразки крові через 2, 15, 30, 60, 120, 240 і 480 хвилин після введення дози для аналізу ферментної активності на плямах сухої крові. Фармакокінетичні аналізи проводили із застосуванням Phoenix WinNonlin® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

Таблиця 4

Схема фармакокінетичного дослідження

Група	# тварин (Ч/Ж)	Дослідний зразок	Доза (мг/кг)	Режим дозування	Відбір зразків та Аналіз
1	10 (6/4)	Fabrazyme®	1	Одноразова доза/IV	Зразки крові зібрані на 2, 15, 30, 60, 120, 240 і 480 хвилинах після введення дози для аналізу ферментної активності на сухих зразках крові (DBS)
2	10 (6/4)	Друге покоління Fabrazyme (Fz2G)	1		

- Дані демонструють, що фармакокінетичні показники Fabrazyme® і рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого у даному документі (FZ2G), у аналізовані точки часу (фігура 40) є подібними. Після збирання зразків у вигляді плям сухої крові активність ферменту та відсутність концентрації розраховували у кожну точку часу. У цілому дані демонструють подібну ферментну активність між ферментами після одноразового внутрішньовенного введення Fabrazyme® і рекомбінантного білка α -галактозидази-А людини, представленого у даному документі (FZ2G), у аналізовані точки часу.

Інші варіанти здійснення

- Слід розуміти, що, тоді як даний винахід описаний в поєднанні з його докладним описом, вищенаведений опис призначений для ілюстрації, а не обмеження обсягу даного винаходу, який визначається обсягом прикладеної формули винаходу. Інші аспекти, переваги й модифікації попадають в обсяг наступної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Genzyme Corporation

<120> РЕКОМБІНАНТНІ ГЛІКОПРОТЕЇНИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 37488-0005wo1

<150> 61/894879

<151> 2013-10-23

<150> 61/901942

<151> 2013-11-08

<160> 3

<170> FastSEQ для Windows версія 4.0

<210> 1

<211> 1287

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atgcagctga ggaacccaga actacatctg ggctgcgcgc ttgcgcttcg cttcctggcc 60
ctcgtttcct gggacatccc tggggctaga gcaactggaca atggattggc aaggacgcct 120
accatgggct ggctgcaact ggagcgcttc atgtgcaacc ttgactgcca ggaagagcca 180
gattcctgca tcagttagaa gctcttcctg gagatggcag agctcatggt ctcagaaggc 240
tggaaggatg caggttatga gtacctctgc attgatgact gttggatggc tccccaaaga 300
gattcagaag gcagacttca ggcagaccct cagcgcttcc ctcatgggat tcgccagcta 360
gctaattatg ttcacagcaa aggactgaag ctagggtatt atgcagatgt tggaaaataa 420
acctgcgcag gcttccctgg gagttttgga tactacgaca ttgatgcccc gacctttgct 480
gactggggag tagatctgct aaaatttgat ggttggtact gtgacagttt ggaataattg 540
gcagatgggt ataagcacat gtccttggcc ctgaatagga ctggcagaag cattgtgtac 600
tcctgtgagt ggcctcttta tatgtggccc ttcaaaaagc ccaattatac agaaatccga 660
cagtactgca atcactggcg aaattttgct gacattgatg attcctggaa aagtataaag 720
agtatcttgg actggacatc ttttaaccag gagagaattg ttgatgttgc tggaccaggg 780
ggttggaatg acccagatat gttagtgttt ggcaactttg gcctcagctg gaatcagcaa 840
gtaactcaga tggccctctg ggctatcatg cctgctcctt tattcatgtc taatgacctc 900
cgacacatca gccctcaagc caaagctctc cttcaggata aggacgtaat tgccatcaat 960
caggaccctt tgggcaagca agggtagcag cttagacagg gagacaactt tgaagtgtgg 1020
gaacgacctc tctcaggctt agcctgggct gtagctatga taaaccggca ggagattggt 1080
ggacctcgct cttataccat cgcagttgct tccctgggta aaggagtggc ctgtaatcct 1140
gcctgcttca tcacacagct cctccctgtg aaaagggaagc taggggtcta tgaatggact 1200
tcaagggtta gaagtcacat aaatcccaca ggcactgttt tgcttcagct agaaaataca 1260
atgcagatgt cattaaaaga cttactt 1287
```

<210> 2

<211> 429

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

```

130      135      140
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
145      150      155
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
165      170      175
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
180      185
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
195      200
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
210      215      220
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
225      230      235
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
245      250      255
Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
260      265      270
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
275      280      285
Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
290      295      300
Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305      310      315
Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
325      330      335
Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
340      345      350
Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
355      360      365
Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
370      375      380
Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385      390      395
Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
405      410      415
Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
420      425

```

```

<210> 3
<211> 398
<212> БІЛОК
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 3
Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
1      5      10
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
20      25      30
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
35      40      45
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
50      55      60
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
65      70      75      80
Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
85      90      95
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
100      105      110
Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
115      120      125
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
130      135      140
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
145      150      155
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
165      170      175
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
180      185      190
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
195      200      205

```



```

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
210 215 220
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
225 230 235 240
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
245 250 255
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
260 265 270
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
275 280 285
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
290 295 300
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
305 310 315 320
Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
325 330 335
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
340 345 350
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
355 360 365
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
370 375 380
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
385 390 395

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рекомбінантний білок α -галактозидази-А людини (rhAGA), що має:
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди, без вмісту фукози, який становить від 0,1 до 1,5 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить більш ніж 9 %.
- 10 відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить більш ніж 13,5 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трирозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж 2,0 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально
- 15 заряджені олігосахариди, який становить від 0,1 до 3,9 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить від 0,1 до 3,0 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані олігосахариди, який становить від 0,1 до 5,3 %;
- 20 відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трирозгалужені трисіалільовані олігосахариди форми 1, який становить від 0,1 до 9,0 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить від 1 до 7,0 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою
- 25 монофосфориловані олігосахариди, який становить більш ніж 14,8 %;
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалільовані олігосахариди, який становить більш ніж 4,9 %; і
 - відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані та монофосфориловані олігосахариди, який становить більш ніж 8,2 %.
- 30 2. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди без вмісту фукози, який становить від 0,1 до 1,3 %.
3. Білок rhAGA за п. 2, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди без вмісту фукози, який
- 35 становить від 0,1 до 1,0 %.
4. Білок rhAGA за п. 3, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані олігосахариди без вмісту фукози, який становить від 0,1 до 0,7 %.
5. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних
- 40 олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить більш ніж 9,5 %.

6. Білок rhAGA за п. 5, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою біс-манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить більш ніж 10,0 %.
- 5 7. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить більш ніж 13,8 %.
8. Білок rhAGA за п. 7, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить більш ніж 14,0 %.
- 10 9. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж 4 %.
10. Білок rhAGA за п. 9, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 2, який становить більш ніж 6 %.
- 15 11. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має співвідношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж 3,0.
12. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має співвідношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж 3,2.
- 20 13. Білок rhAGA за п. 12, де білок rhAGA має співвідношення моль/моль сілової кислоти/білка, яке становить більш ніж 3,4.
14. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди, який становить від 0,1 до 3,0 %.
- 25 15. Білок rhAGA за п. 14, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою нейтрально заряджені олігосахариди, який становить від 0,1 до 2,0 %.
16. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить від 1,0 до 2,0 %.
- 30 17. Білок rhAGA за п. 16, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалільовані фукозовмісні олігосахариди, який становить від 1,5 до 2,0 %.
18. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані олігосахариди, який становить від 3,0 до 5,0 %.
- 35 19. Білок rhAGA за п. 18, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою бісіалільовані олігосахариди, який становить від 4,0 до 5,0 %.
- 40 20. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 1, який становить від 0,5 до 8,0 %.
21. Білок rhAGA за п. 20, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою трисіалільовані олігосахариди форми 1, який становить від 0,5 до 5,0 %.
- 45 22. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить від 4 до 6,9 %.
23. Білок rhAGA за п. 22, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою манозо-6-фосфатвмісні олігосахариди, який становить від 5 до 6,8 %.
- 50 24. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфосфориловані олігосахариди, який становить більш ніж 15 %.
- 55 25. Білок rhAGA за п. 24, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою монофосфосфориловані олігосахариди, який становить більш ніж 16 %.
26. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою тетрасіалільовані олігосахариди, який становить більш ніж 6 %.
- 60

27. Білок rhAGA за п. 1, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані та монофосфоризовані олігосахариди, який становить більш ніж 8,5 %.
- 5 28. Білок rhAGA за п. 27, де білок rhAGA має відсотковий вміст загальних N-зв'язаних олігосахаридів, що являють собою моносіалізовані та монофосфоризовані олігосахариди, який становить більш ніж 9,0 %.
29. Фармацевтична композиція, що містить білок rhAGA за будь-яким з пп. 1-28 і фармацевтично прийнятний носій.
- 10 30. Фармацевтична композиція за п. 29, де композиція складена для внутрішньовенного, внутрішньоартеріального, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, підшкірного або внутрішньоперитонеального введення.
31. Фармацевтична композиція за п. 30, де фармацевтична композиція має концентрацію rhAGA від 4 до 6 мг/мл.
- 15 32. Фармацевтична композиція за п. 31, де фармацевтична композиція має концентрацію rhAGA 5 мг/мл.
33. Фармацевтична композиція за п. 32, де фармацевтична композиція є стерильним, ліофілізованим порошком.
34. Фармацевтична композиція за п. 33, де фармацевтично прийнятний носій являє собою один або декілька засобів, вибраних з групи, що складається з маніту, натрію фосфату
- 20 одноосновного моногідрату та натрію фосфату двоосновного гептагідрату.
35. Спосіб лікування хвороби Фабрі у суб'єкта, що передбачає введення суб'єкту з хворобою Фабрі терапевтично ефективної кількості білка rhAGA за будь-яким з пп. 1-28.
36. Спосіб за п. 35, де введенням є системне введення.
37. Спосіб за п. 36, де системним введенням є внутрішньовенне введення.
- 25 38. Спосіб за п. 37, де суб'єкту вводять rhAGA у дозі від 0,5 мг/кг ваги тіла до 2,0 мг/кг ваги тіла.
39. Спосіб за п. 38, де суб'єкту вводять білок rhAGA у дозі 1,0 мг/кг ваги тіла.
40. Спосіб за п. 35, де суб'єкту вводять дві або більше доз білка rhAGA.
41. Спосіб за п. 40, де щонайменше дві з двох або більше доз білка rhAGA вводять з інтервалом два тижні.
- 30 42. Спосіб за п. 35, що додатково передбачає введення суб'єкту одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, вибраних з групи, що складається з анальгетиків, антикоагулянтів, інгібіторів ацетилхолінестерази, β -блокаторів та інгібіторів глікозилцерамідсинтази.
43. Спосіб за п. 35, де суб'єктом є суб'єкт-людина.
- 35 44. Спосіб за п. 35, де у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі.
45. Спосіб підвищення рівня білка α -галактозидази-A у лізосомі в клітині ссавця, при цьому спосіб передбачає введення клітини ссавця у контакт з ефективною кількістю rhAGA за будь-яким з пп. 1 - 28.
46. Спосіб за п. 45, де клітина знаходиться *in vitro*.
- 40 47. Спосіб за п. 46, де клітиною є клітина людини.
48. Спосіб за п. 45, де клітина знаходиться в суб'єкті.
49. Спосіб за п. 48, де суб'єктом є людина.
50. Спосіб за п. 48, де у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі.
51. Спосіб за п. 48, де введення у контакт здійснюють шляхом системного введення rhAGA
- 45 суб'єкту.
52. Спосіб за п. 51, де системним введенням є внутрішньовенне введення.
53. Спосіб за п. 52, де суб'єкту вводять rhAGA у дозі від 0,5 мг/кг ваги тіла до 2,0 мг/кг ваги тіла.
54. Спосіб за п. 53, де суб'єкту вводять білок rhAGA у дозі 1,0 мг/кг ваги тіла.
55. Спосіб за п. 52, де суб'єкту вводять дві або більше доз білка rhAGA.
- 50 56. Спосіб за п. 55, де щонайменше дві з двох або більше доз білка rhAGA вводять з інтервалом два тижні.
57. Спосіб зниження рівня глоботриаозилцераміду в сироватці крові суб'єкта, при цьому спосіб передбачає введення суб'єкту, що цього потребує, терапевтично ефективної кількості білка rhAGA за будь-яким з пп. 1-28.
- 55 58. Спосіб за п. 57, де суб'єкт має рівень глоботриаозилцераміду в сироватці крові більш ніж 8 мкл/мл.
59. Спосіб за п. 57, де у суб'єкта було діагностовано хворобу Фабрі.
60. Спосіб за п. 57, де введенням є системне введення.
61. Спосіб за п. 60, де системним введенням є внутрішньовенне введення.
- 60 62. Спосіб за п. 61, де суб'єкту вводять rhAGA у дозі від 0,5 мг/кг ваги тіла до 2,0 мг/кг ваги тіла.

63. Спосіб за п. 62, де суб'єкту вводять білок rhAGA у дозі 1,0 мг/кг ваги тіла.
 64. Спосіб за п. 57, де суб'єкту вводять дві або більше доз білка rhAGA.
 65. Спосіб за п. 64, де щонайменше дві з двох або більше доз білка rhAGA вводять приблизно з інтервалом два тижні.
 5 66. Спосіб за п. 57, що додатково передбачає введення суб'єкту одного або декількох додаткових терапевтичних засобів, вибраних з групи, що складається з анальгетиків, антикоагулянтів, інгібіторів ацетилхолінестерази, β -блокаторів та інгібіторів глюкозилцерамідсинтази.
 67. Спосіб за п. 57, де суб'єктом є людина.

Лізосомні хвороби накопичення та відповідні ферментні дефекти

Хвороба	Ферментний дефект
Хвороба Помпе	кисла α -глюкозидаза (наприклад, Myozyme®, Lumizyme®)
MPSI*(хвороба Гурлера)	α -L-ідуронідаза (наприклад, Aldurazyme®)
MPSII (хвороба Хантера)	ідуронат-сульфатаза
MPSIII (Санфіліппо)	гепаран-N-сульфатаза
MPS IV (Моркіо А)	галактоза-6-сульфатаза
MPS IV (Моркіо В)	кисла β -галактозидаза
MPS VII (хвороба Слая)	β -глюкуронідаза
Хвороба І-клітин	N-ацетилглюкозамін-I-фосфотрансфераза
Хвороба Шидлера	α -N-ацетилгалактозамінідаза (α -галактозидаза В)
Хвороба Волмана	кисла ліпаза
Хвороба накопичення ефіру холестерину	кисла ліпаза
Хвороба Фарбера	лізосомна кисла керамідаза
Хвороба Німана-Піка	кисла сфінгомеліназа
Хвороба Гаучера	β -глюкозидаза (Ceredase®, Cerezyme®)
Хвороба Краббе	галактозилцерамідаза
Хвороба Фабрі	α -галактозидаза А
GMI гангліозидоз	кисла β -галактозидаза
Галактосіалідоз	β -галактозидаза та нейрамінідаза
Хвороба Тей-Сакса	гексамінідаза А
Хвороба Сандгоффа	гексамінідаза А та В

* MPS = мукополісахаридоз

Фіг. 1

**Блок-попередник альфа-галактозидази-А людини та кДНК
(SEQ ID NO: 1 і 2)**

```

ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG CTT
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
  1           5           10           15

CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA GCA CTG
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
          20           25           30

GAC AAT GGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG CAC TGG GAG
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
          35           40           45

CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA GAT TCC TGC ATC
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
          50           55           60

AGT GAG AAG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC ATG GTC TCA GAA GGC
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
          65           70           75           80

TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC ATT GAT GAC TGT TGG ATG
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
          85           90           95

GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA CTT CAG GCA GAC CCT CAG CGC
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
          100          105          110

TTT CCT CAT GGG ATT CGC CAG CTA GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
          115          120          125

CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
          130          135          140

TTC CCT GGG AGT TTT GGA TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
          145          150          155          160

GAC TGG GGA GTA GAT CTG CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
          165          170          175

TTG GAA AAT TTG GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
          180          185          190

```

Фіг. 2 (стор. 1 з 3)

```

AGG ACT GGC AGA AGC ATT GTG TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATG
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
      195                      200                      205

TGG CCC TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
      210                      215                      220

CAC TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT GAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
      225                      230                      235                      240

AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT GTT
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
      245                      250                      255

GCT GGA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATG TTA GTG ATT GGC AAC
Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
      260                      265                      270

TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC CTC TGG GCT
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
      275                      280                      285

ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC CGA CAC ATC AGC
Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
      290                      295                      300

CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC GTA ATT GCC ATC AAT
Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
      305                      310                      315                      320

CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG CTT AGA CAG GGA GAC AAC
Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
      325                      330                      335

TTT GAA GTG TGG GAA CGA CCT CTC TCA GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT
Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
      340                      345                      350

ATG ATA AAC CGG CAG GAG ATT GGT GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA
Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
      355                      360                      365

GTT GCT TCC CTG GGT AAA GGA GTG GCC TGT AAT CCT GCC TGC TTC ATC
Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
      370                      375                      380

```

Фиг. 2 (стр. 2 з 3)

```

ACA CAG CTC CTC CCT GTG AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TGG ACT
Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385              390              395              400

TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG
Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
405              410              415

CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAAAAAAAAA
Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
420              425              430

```

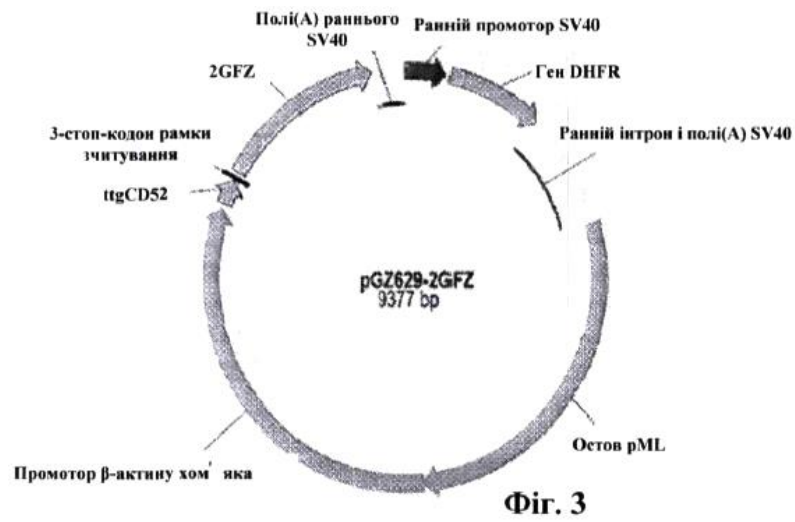
Зріла альфа-галактозидаза-А людини (SEQ ID NO: 3)

```

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp 16
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys 32
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu 48
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp 64
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln 80
Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys 96
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala 112
Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe 128
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp 144
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu 160
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Vys Glu Trp Pro Leu Tyr 176
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys 192
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile 208
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp 224
Val Ala Gly Pro Gly Gly trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly 240
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp 256
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile 272
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile 288
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp 304
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val 320
Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile 336
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe 352
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp 368
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu 384
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu 398

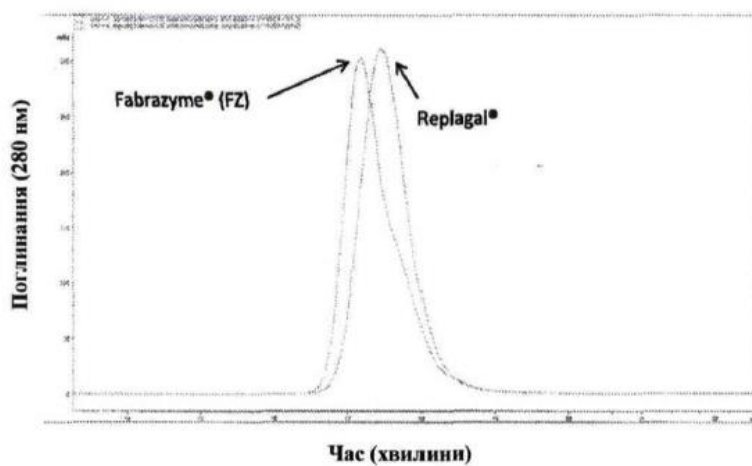
```

Фіг. 2 (стор. 3 з 3)





Фіг. 5



Фіг. 6

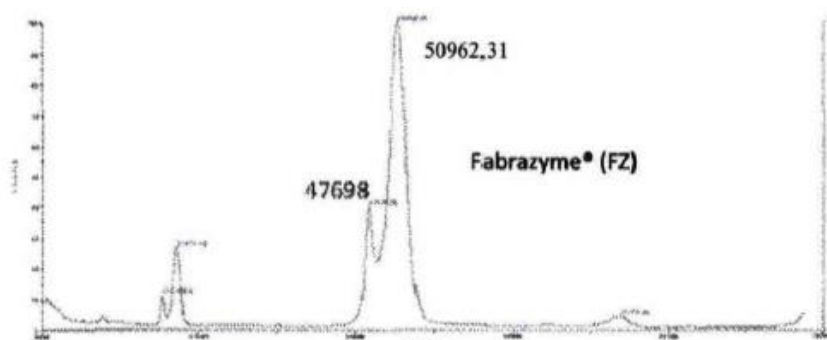


Fig. 7A

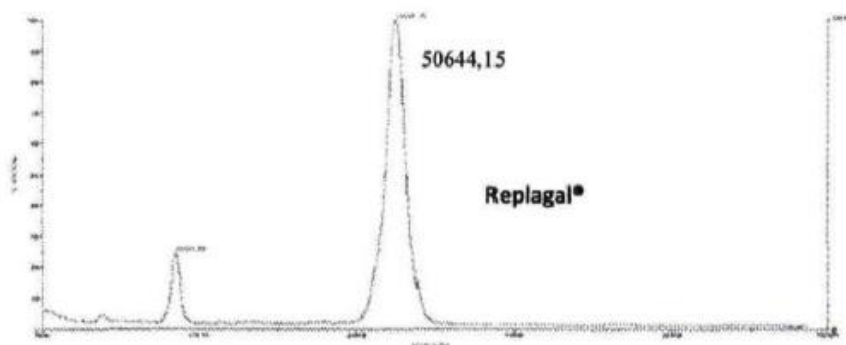


Fig. 7B

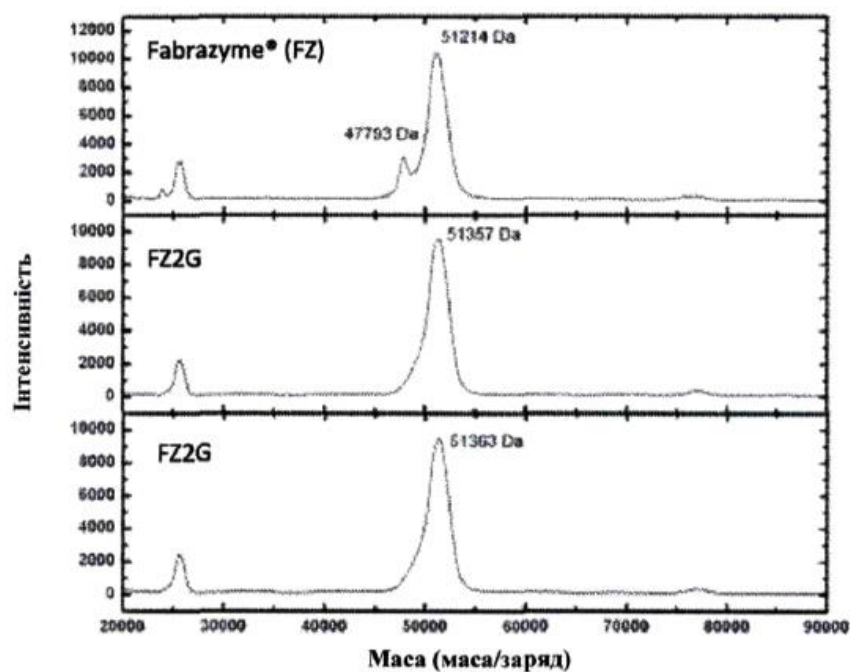
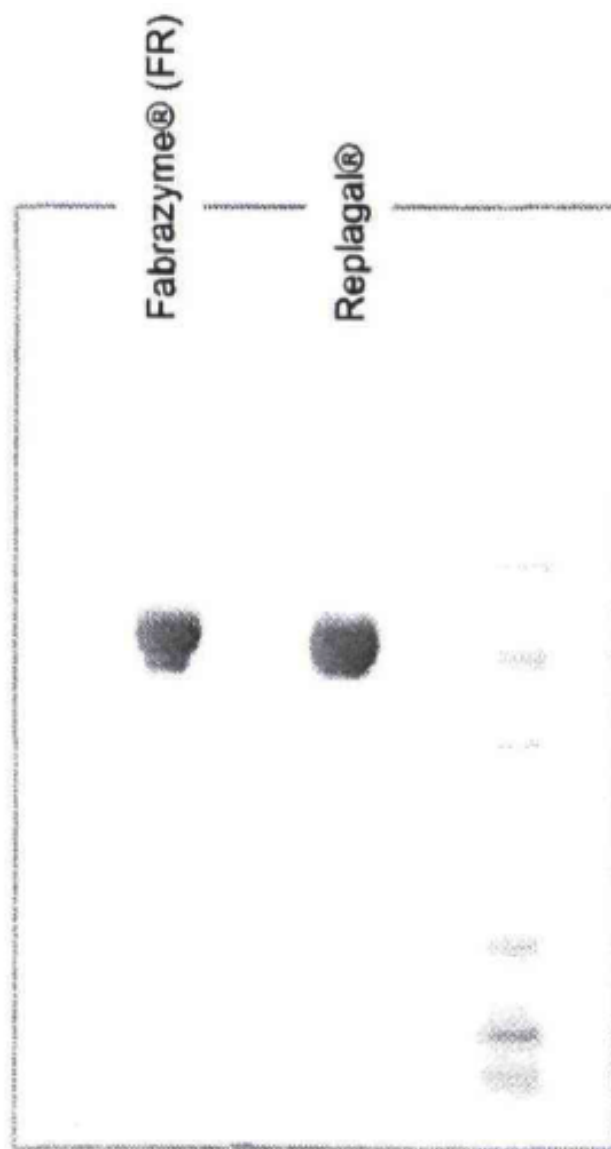
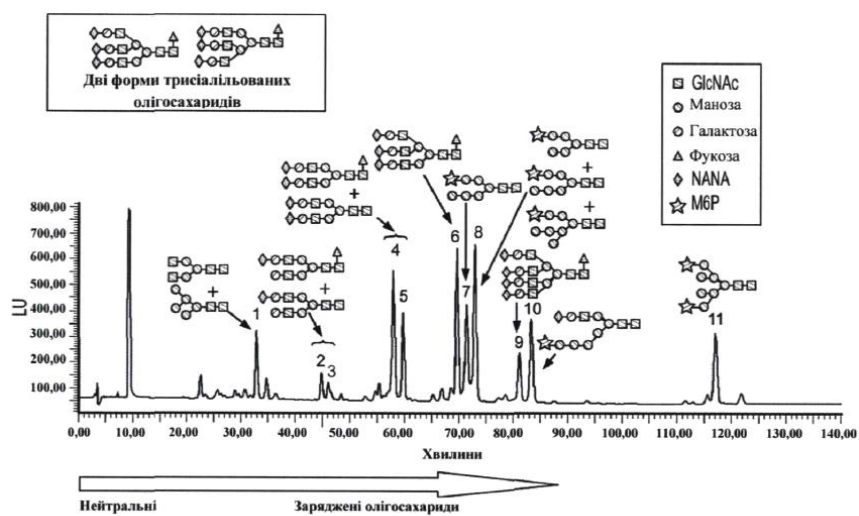


Fig. 8

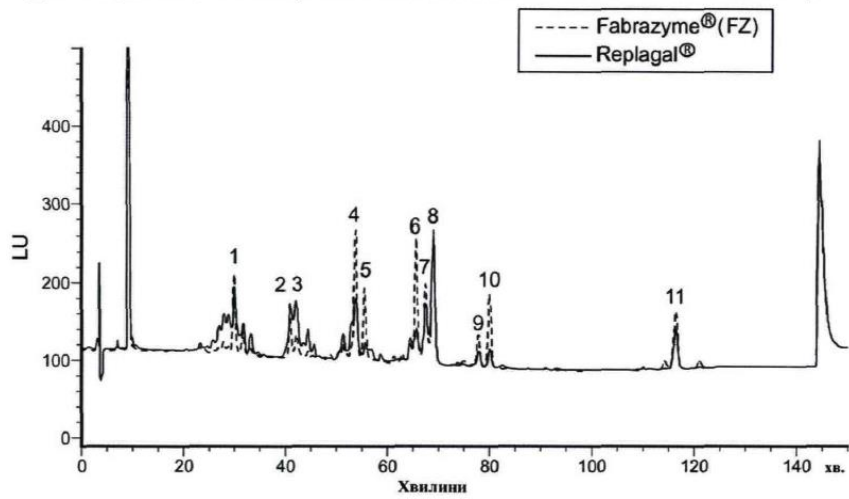


Фіг. 9

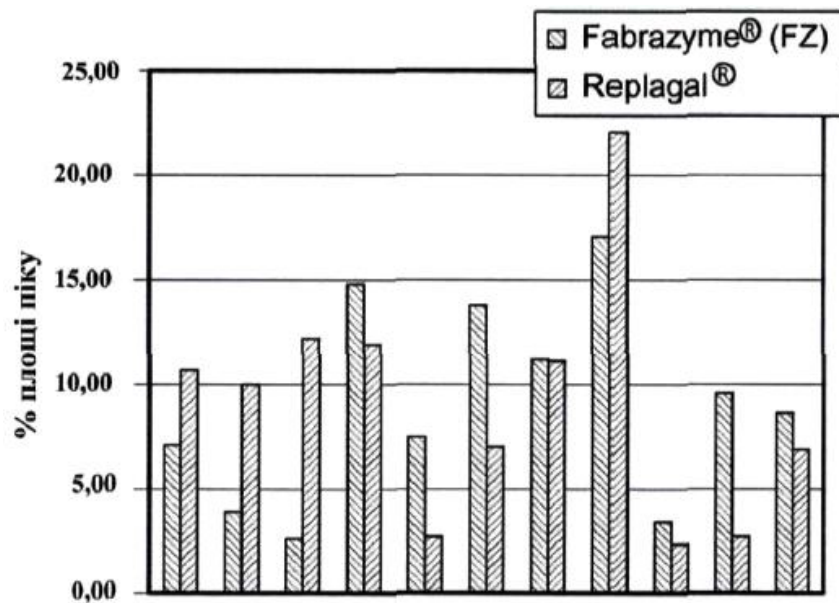


Фіг. 10

□ FLD1 A, Ex=230, Em=425 (CT040312\CT040312 2012-04-0316-39-32\002-0201.D)
 □ FLD1 A, Ex=230, Em=425 (CT040312\CT040312 2012-04-0316-39-32\003-0301.D)



Фіг. 11



Фіг. 12

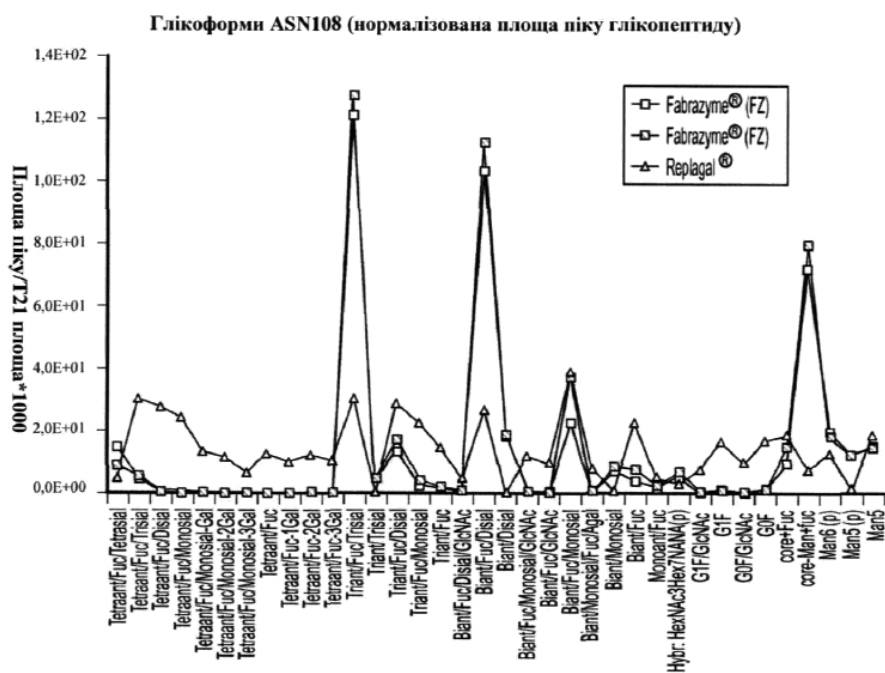


Fig. 13

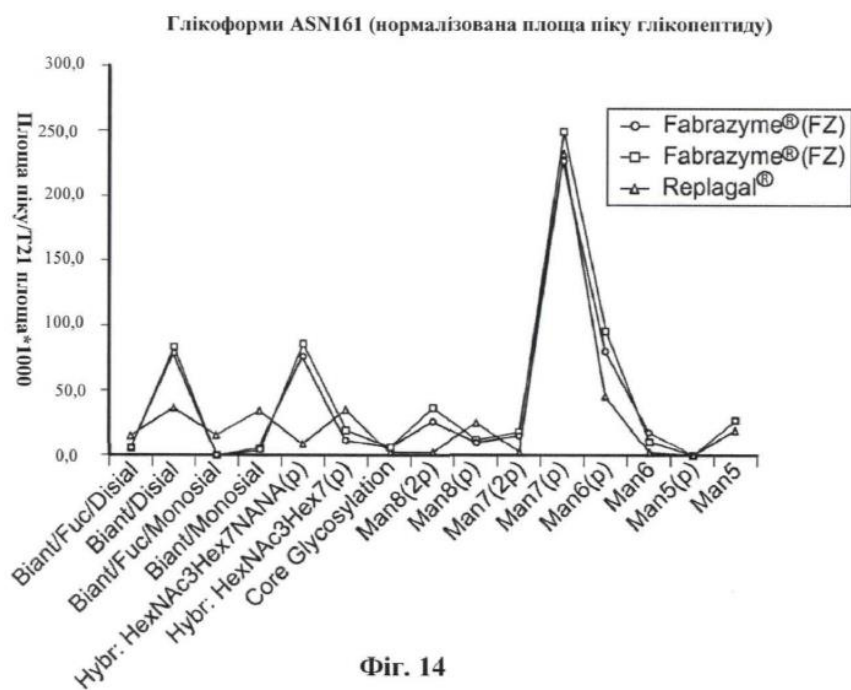
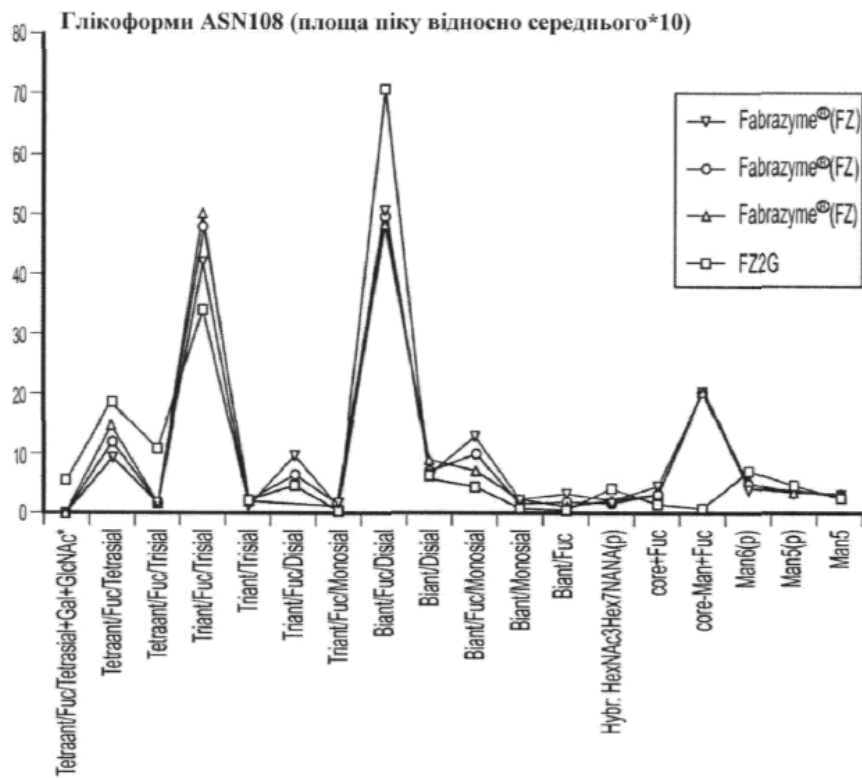
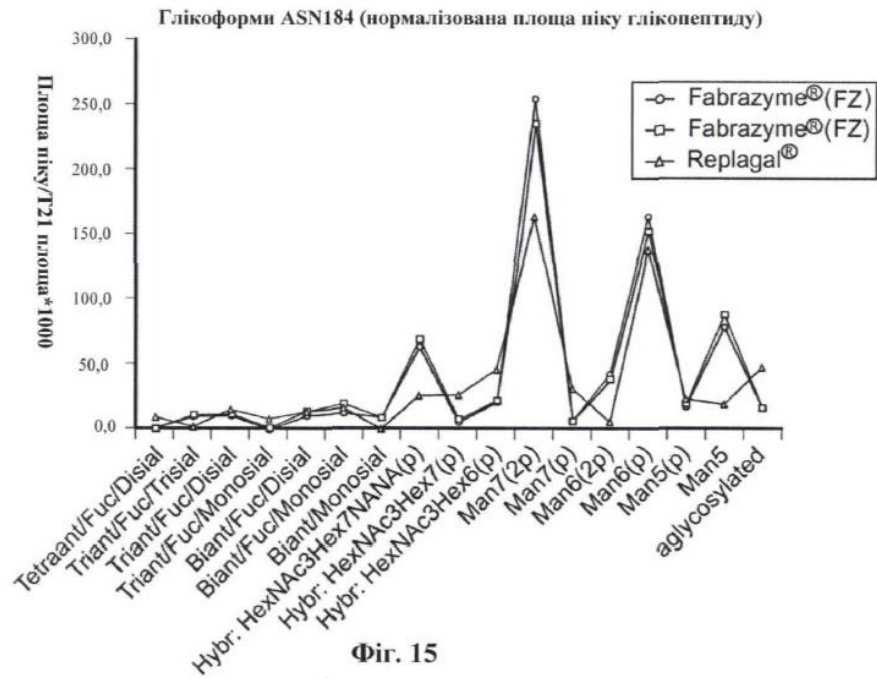
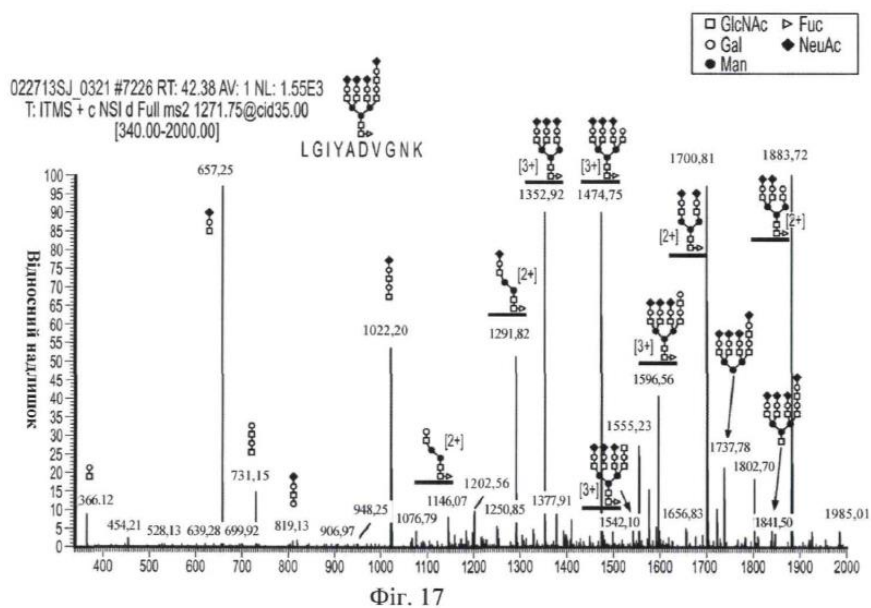
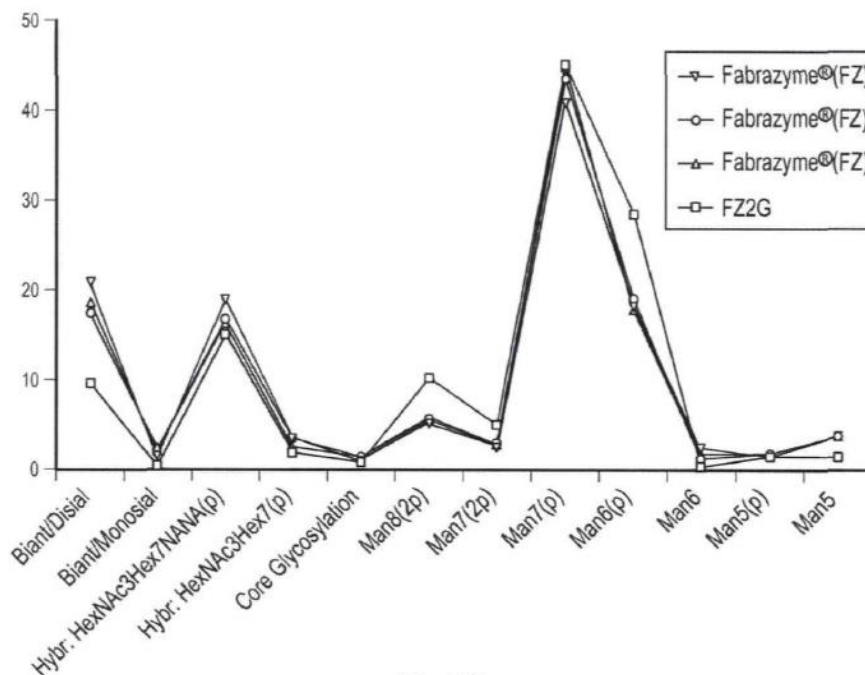


Fig. 14





Глікоформи ASN161 (площа піку відносно середнього*10)



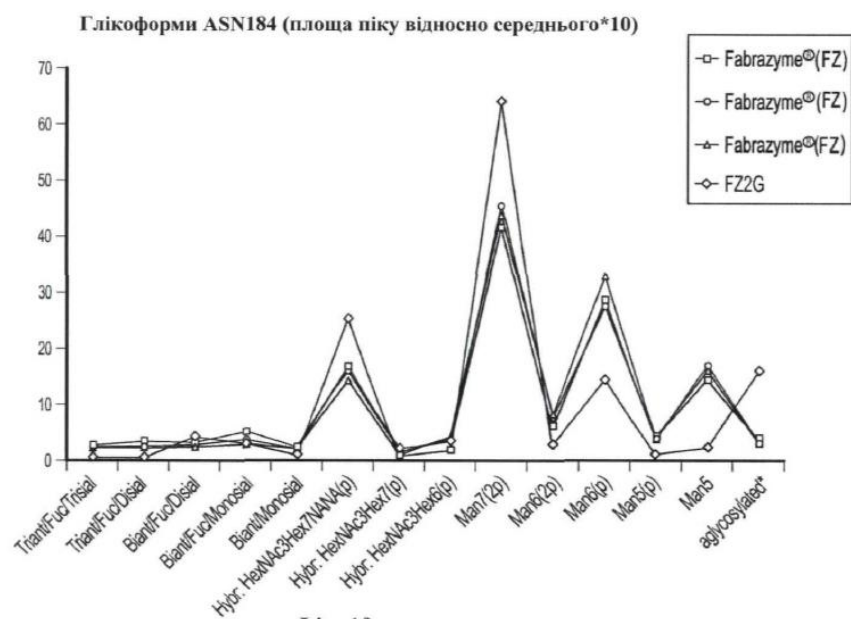


Fig. 19

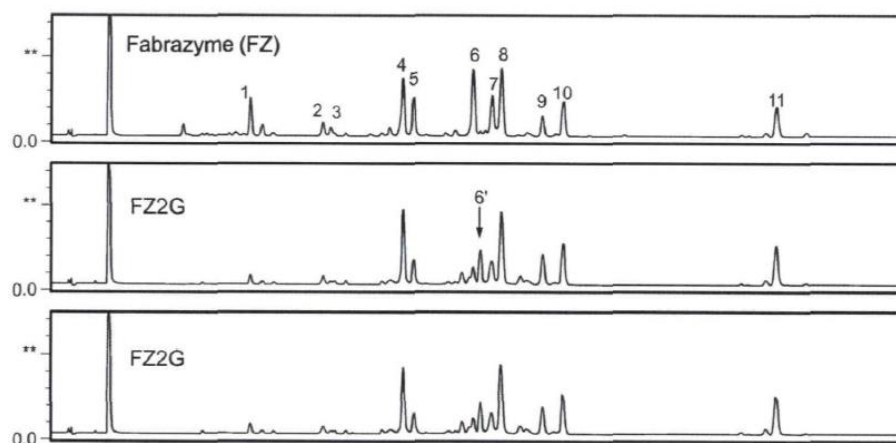
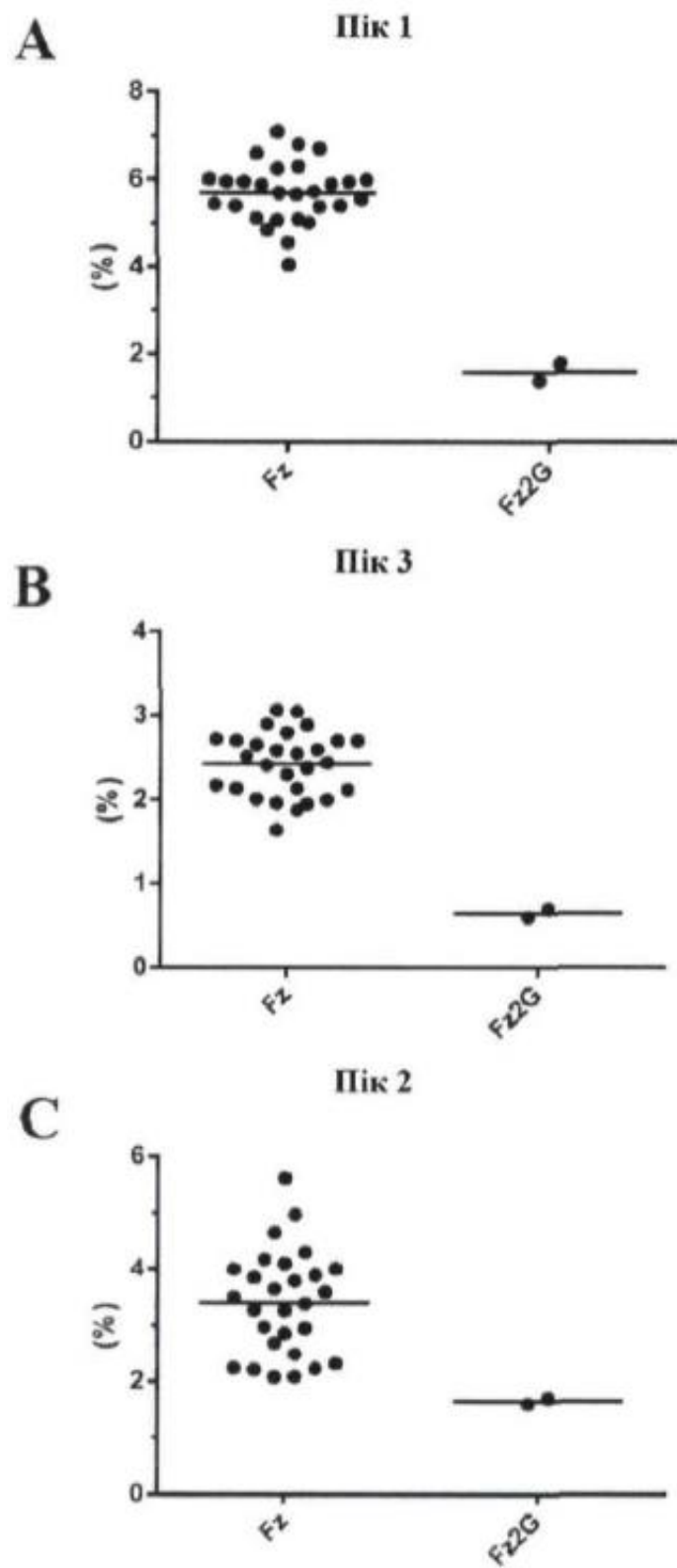
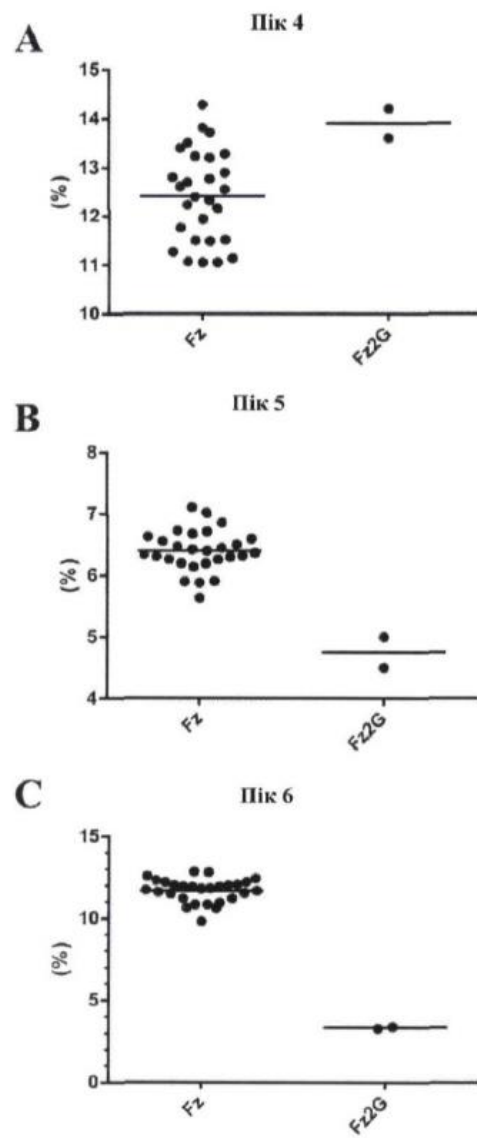


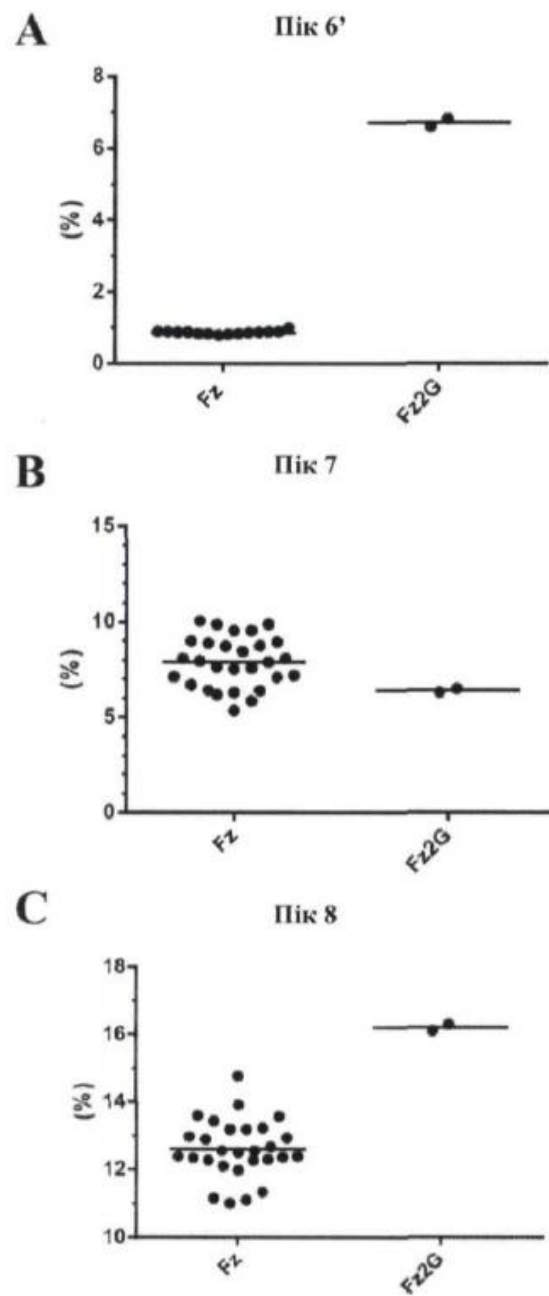
Fig. 20



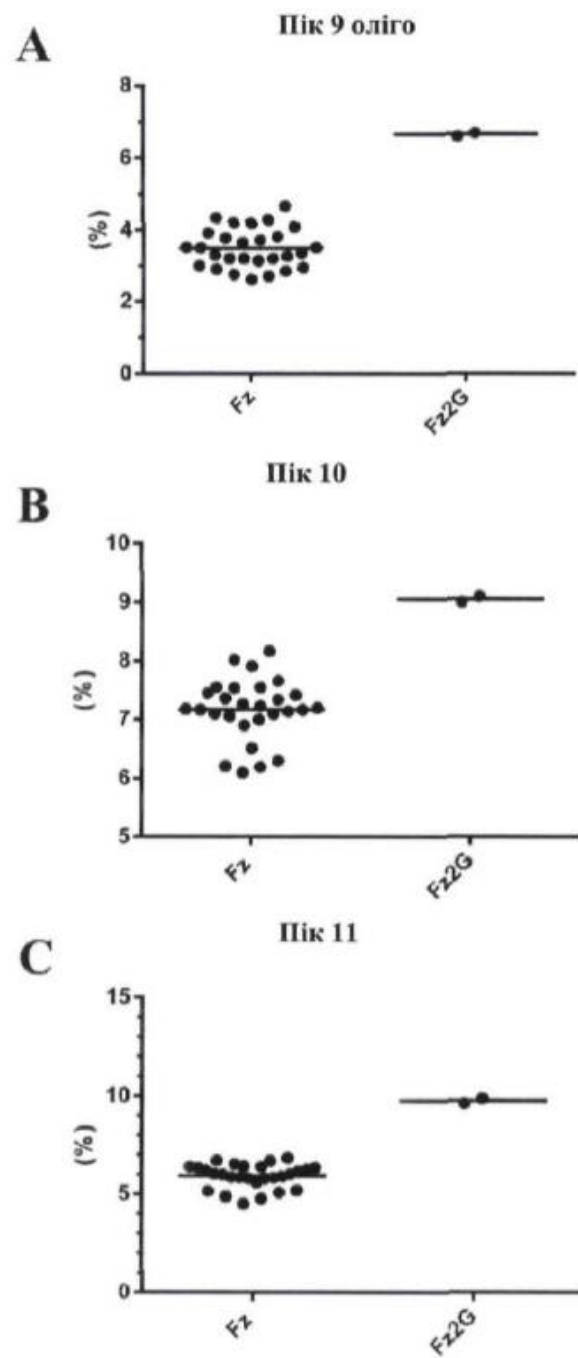
Фіг. 21



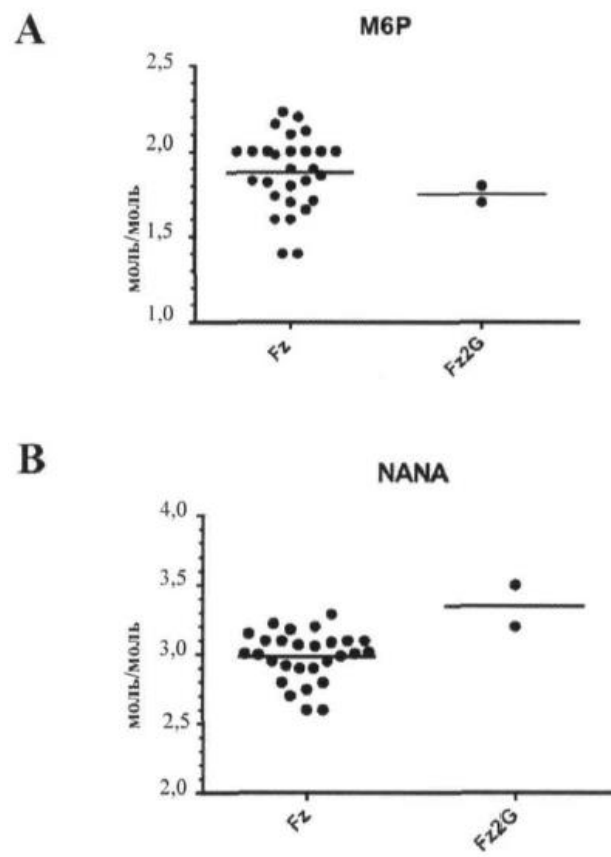
Фиг. 22



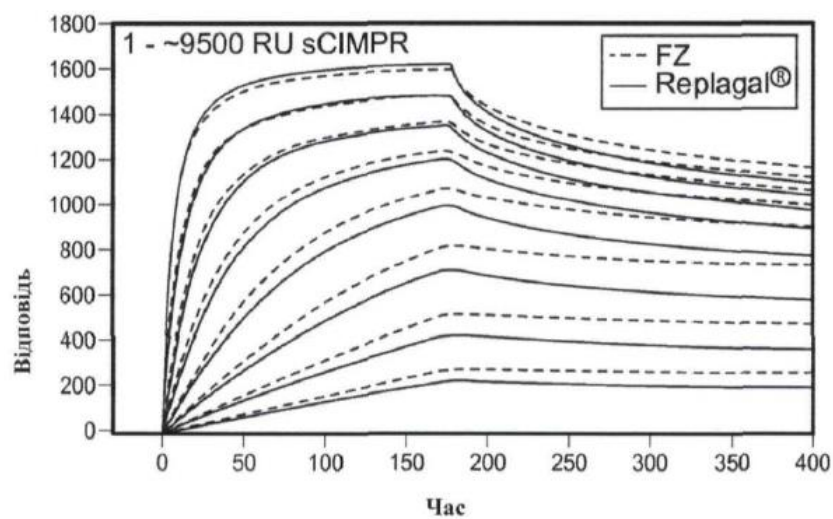
Фиг. 23



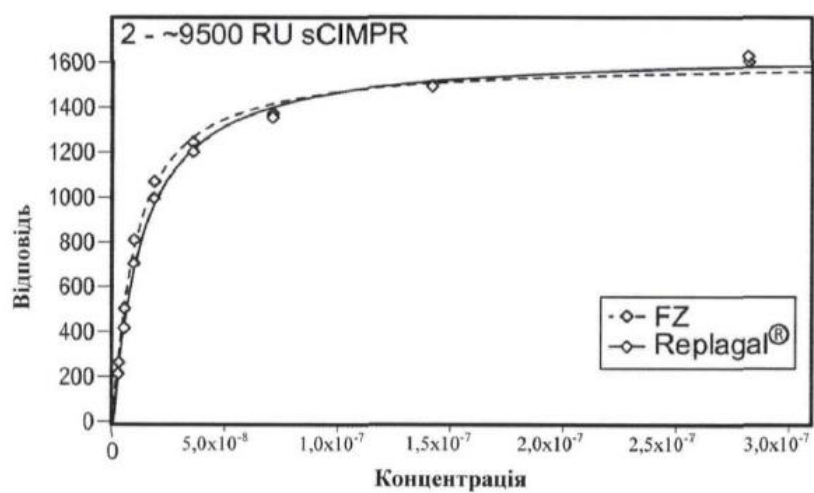
Фіг. 24



Фиг. 25



Фіг. 26



Фіг. 27

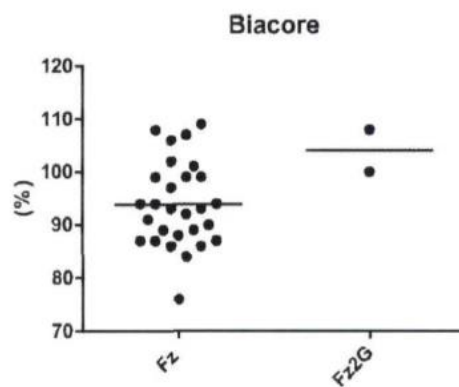


Fig. 28

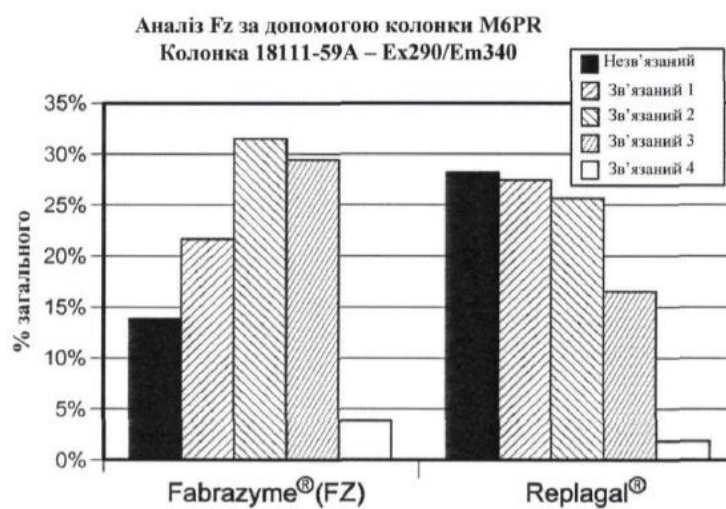
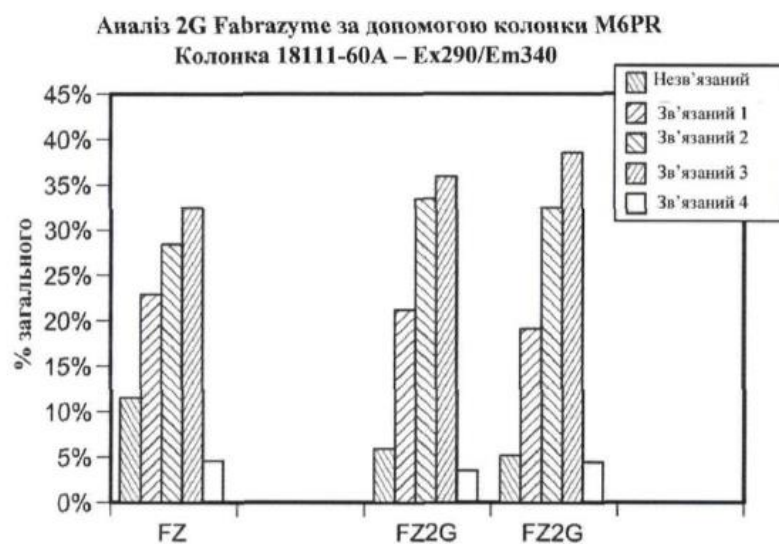
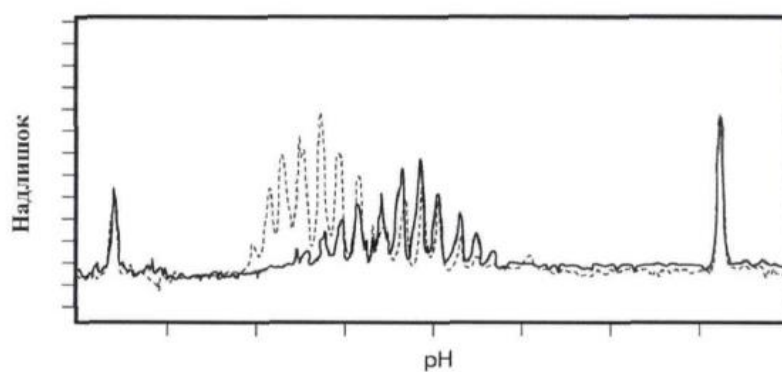


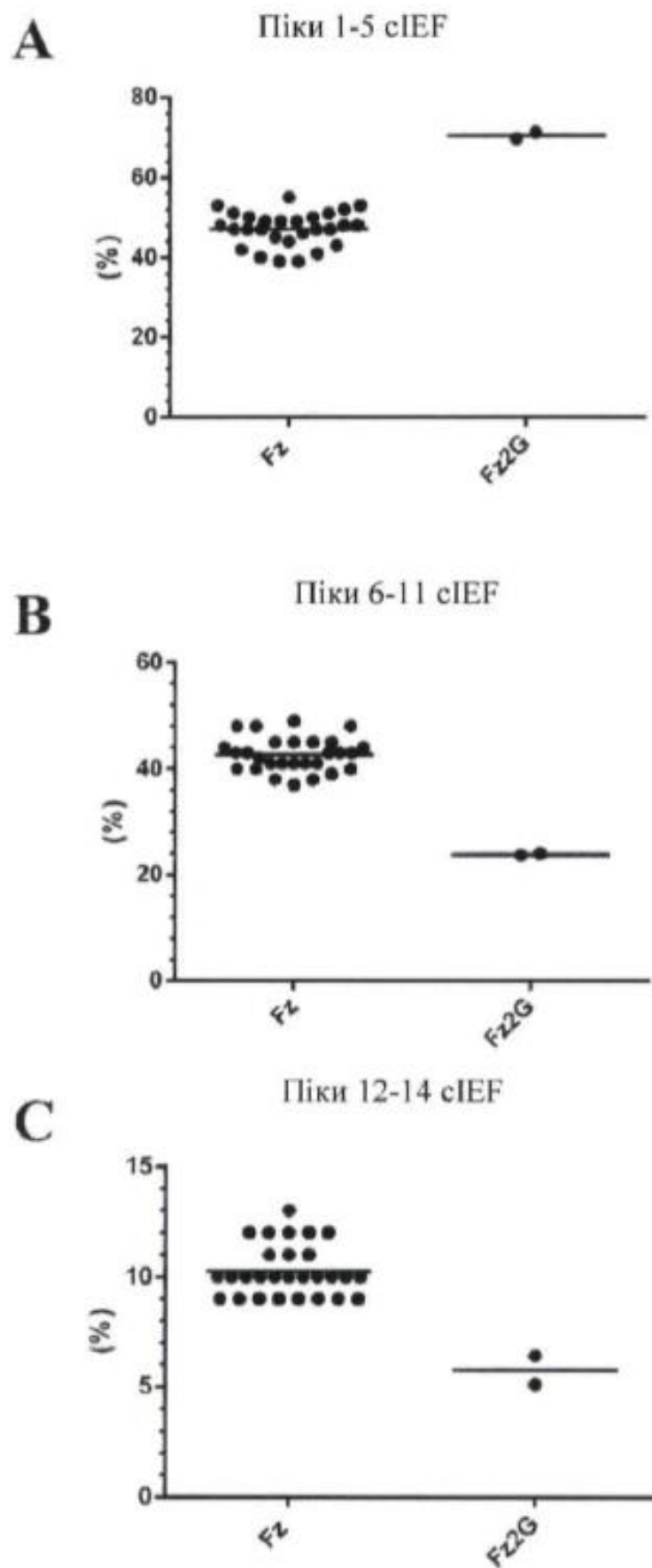
Fig. 29



Фіг. 30



Фіг. 31



Фіг. 32

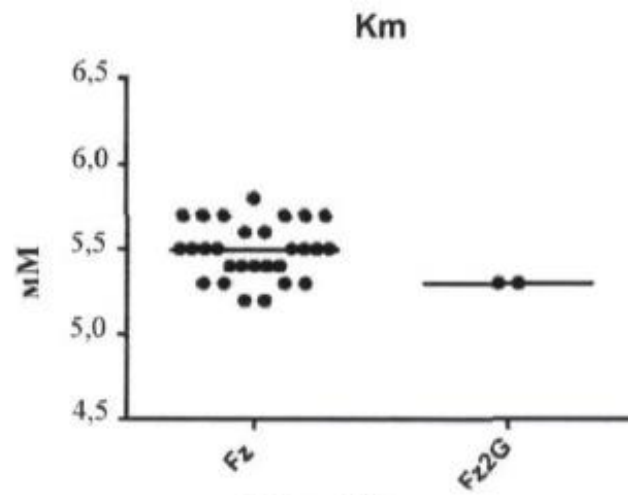


Fig. 33

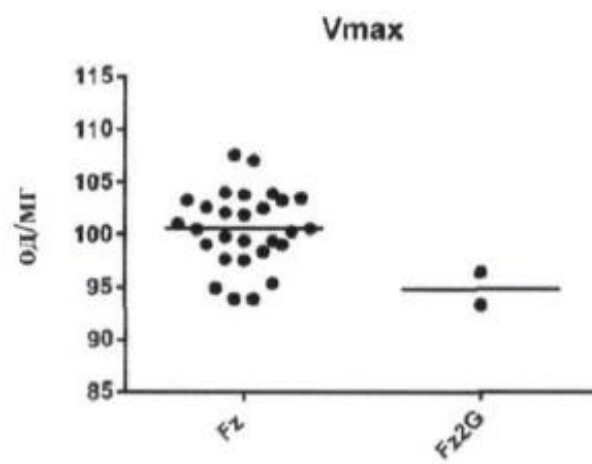
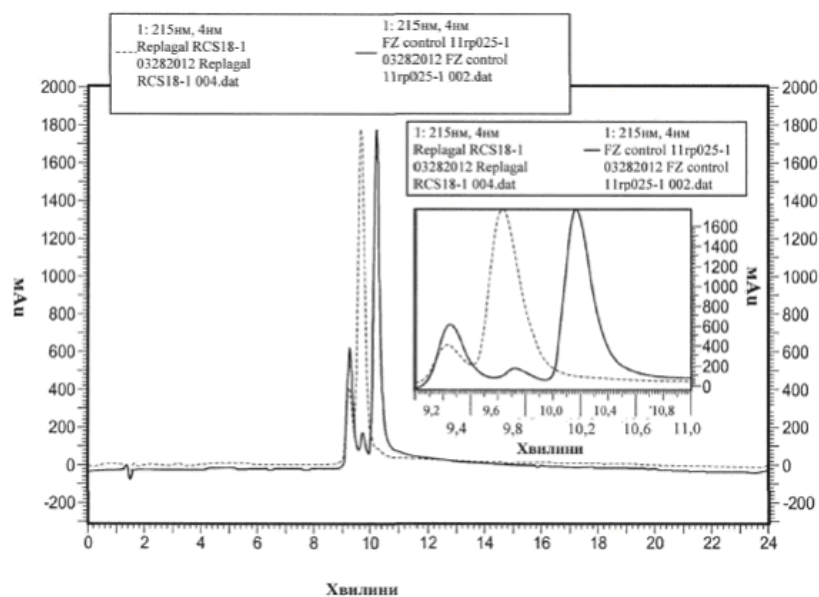
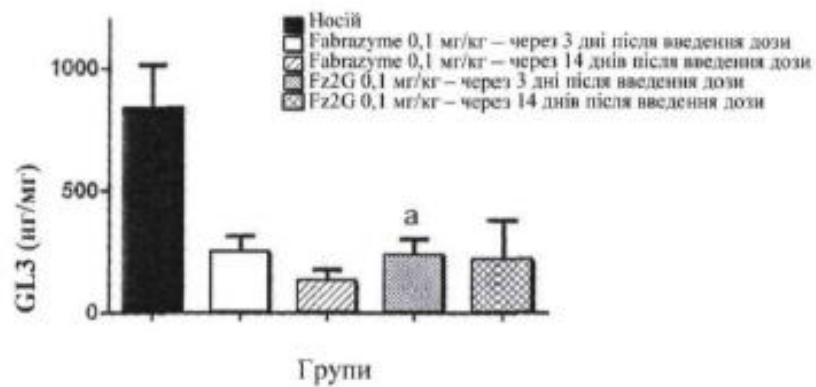


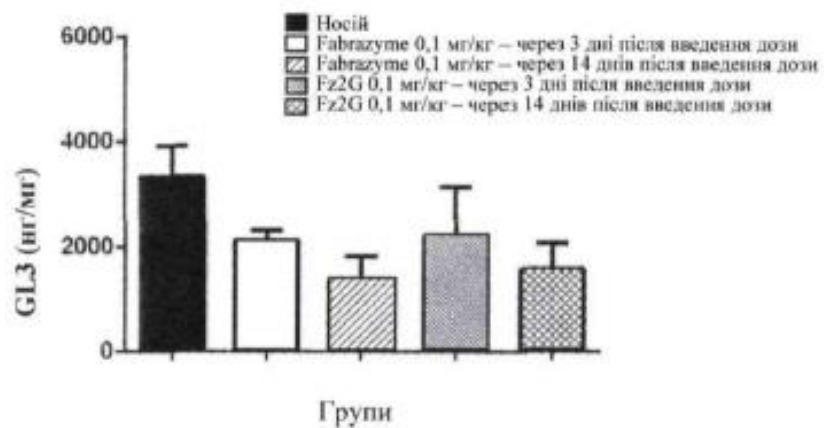
Fig. 34



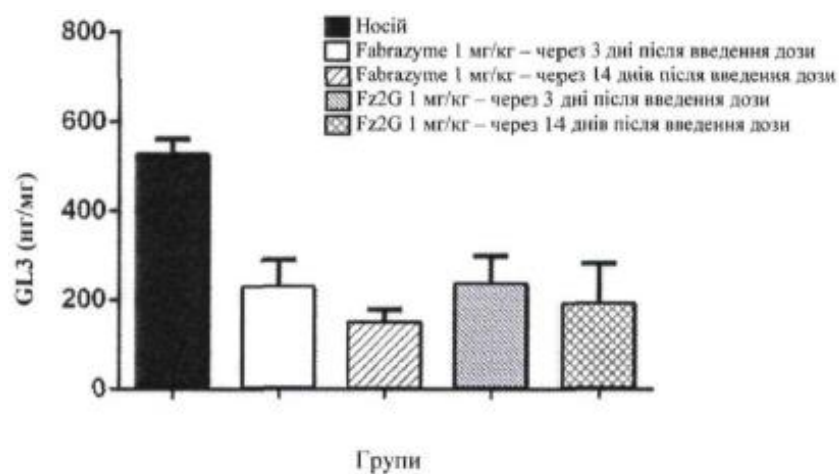
Фіг. 35



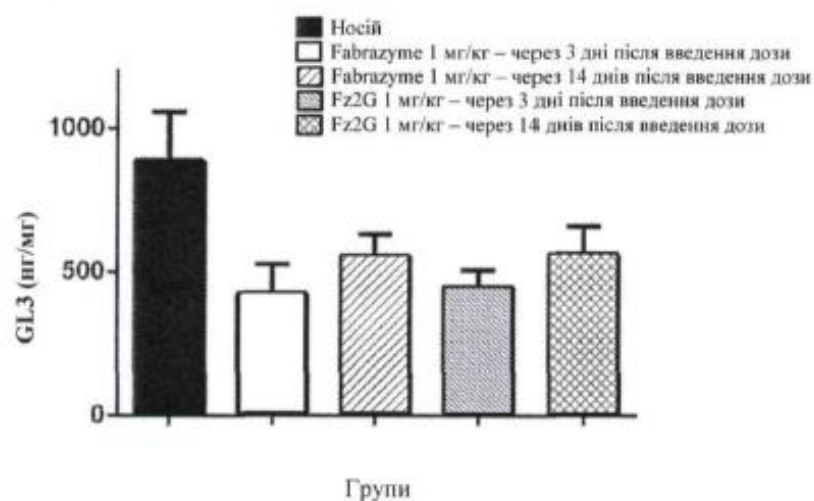
Фіг. 36



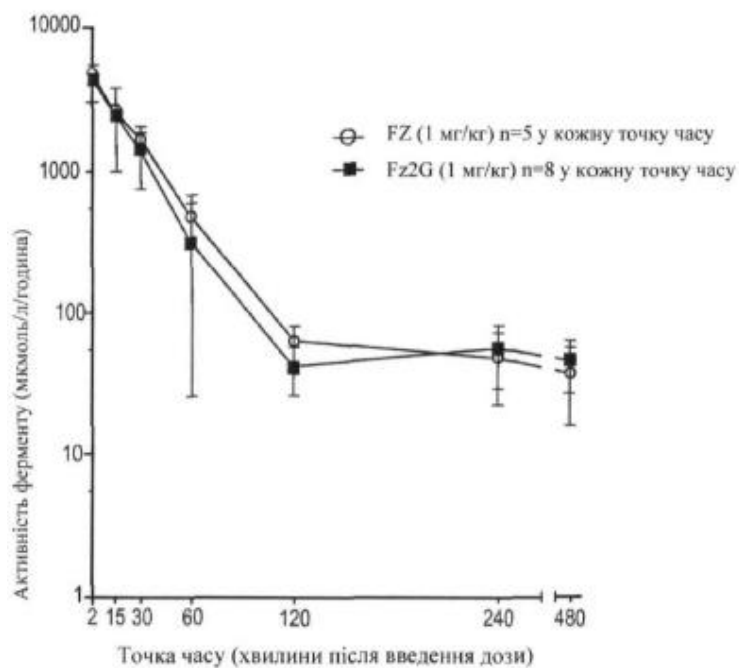
Фіг. 37



Фіг. 38



Фіг. 39



Фіг. 40

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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