



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120432** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

**C07K 14/435** (2006.01)**A61K 38/00****C12N 9/14** (2006.01)**C12N 9/96** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2016 10956</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Берґхард Шарлотта (SE), Нордлінґ Ерік (SE), Свенссон Геліус Стефан (SE), Тьєрнберг Аґнета (SE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>01.04.2015</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>СВЕДІШ ОРФАН БІОВІТРУМ АБ (ПАБЛ), S-112 76 Stockholm, Sweden (SE)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.12.2019</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>14162996.4</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>TINA ROZAKLIS et al. Impact of high-dose, chemically modified sulfamidase on pathology in a murine model of MPS INA. Experimental neurology, 2011, Vol. 230, no. 1, P. 123 - 130 RECKSIEK M. Sulfatases, Trapping of the Sulfated Enzyme Intermediate by Substituting the Active Site Formylglycine. Journal of biological chemistry, 1998, Vol. 273, no. 11, P. 6096 - 6103 WO 2008109677 A2, 12.09.2008</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>01.04.2014</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>EP</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>27.02.2017, Бюл.№ 4</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.12.2019, Бюл.№ 23</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2015/057256, 01.04.2015</b>		

**(54) МОДИФІКОВАНА СУЛЬФАМІДАЗА І ЇЇ ОДЕРЖАННЯ****(57) Реферат:**

Винахід стосується модифікованої сульфамідази, що містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, визначеної в SEQ ID NO: 1, або поліпептид, що має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, визначеною в SEQ ID NO: 1, де природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази руйнуються шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків в олігоманозних гліканах від загального дорівнює принаймні 60 %, зазначена модифікована сульфамідаза не має по суті епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, зазначені епітопи відсутні в чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) зазначеного поліпептиду модифікованої сульфамідази, і де олігоманозний глікан у сайті N-глікозилювання N в положенні 131 (N(131)) руйнується шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків від загального дорівнює принаймні 60 %, таким чином дозволяючи переносити зазначену сульфамідазу через гематоенцефалічний бар'єр ссавця, де зазначена сульфамідаза має каталітичну активність в головному мозку зазначеного ссавця.

UA 120432 C2



## Галузь техніки

Даний винахід стосується модифікованої сульфамідази, композицій, що містять модифіковану сульфамідазу, та способів одержання модифікованої сульфамідази. Крім того, розкривається використання модифікованої сульфамідази в терапії, в якості лікування

5 лізосомної хвороби накопичення.

## Попередній рівень техніки

## Лізосомна хвороба накопичення

Лізосомальний компартмент діє в якості катаболічного механізму, що розщеплює відходи в клітинах. Розщеплення досягається за рахунок ряду гідролаз і переносників, конкретно

10 віднесених до категорії лізосом. На сьогоднішній день виявлено більше 40 спадкових захворювань, в яких було встановлено зв'язок між хворобою і мутаціями в генах, що кодують білки лізосом. Ці захворювання позначаються як лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) і характеризуються накопиченням метаболіту (або метаболітів), які не можуть бути розщеплені через недостатню здатність до розщеплення. Як наслідок надмірного лізосомного накопичення

15 метаболіту, лізосоми збільшуються в розмірах. До кінця ще не вивчено, як накопичений акумулюючий матеріал викликає патологію, але це може включати в себе такі механізми, як інгібування аутофагії і індукція апоптозу клітин (Cox & Cachón-González, J Pathol 226: 241-254 (2012)).

## Ферментозамісна терапія

20 Накопичення можна зменшити шляхом введення лізосомального ферменту з гетерологічного джерела. Також встановлено, що внутрішньовенне введення лізосомального ферменту призводить до його швидкого поглинання клітинами через механізм, званий рецепторно-опосередкованим ендцитозом. Цей ендцитоз опосередковується рецепторами на поверхні клітини, і, зокрема, було виявлено, що два маноза-6-фосфат-рецептори (M6PR) мають

25 вирішальне значення для поглинання певних лізосомальних ферментів (Neufeld; Birth Defects Orig Artic Ser 16: 77-84 (1980)). M6PR розпізнає фосфорильовані глікани олігоманози, які характерні для лізосомних білків.

Грунтуючись на принципі рецепторно-опосередкованого ендцитоза, ферментозамісна терапія (ФЗТ) сьогодні доступні для шести ЛХН (Гоше, Фабрі, Помпе і Мукополісахаридоз типу I, II і VI). Ці методи лікування є ефективними для зниження лізосомного накопичення в різних

30 периферичних органах і, тим самим, поліпшують деякі симптоми, пов'язані з патологією.

Однак, більшість ЛХН призводять до лізосомного накопичення в центральній нервовій системі (ЦНС) і, отже, представляють набір ознак і симптомів, пов'язаних з ЦНС. Головним недоліком внутрішньовенного введення ФЗТ є поганий розподіл в ЦНС. ЦНС захищена від впливу гемоконтактних сполук за допомогою гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), утвореного

35 ендотелієм ЦНС. Ендотеліоцити ГЕБ демонструють щільні з'єднання, які перешкоджають парацеллюлярному проходженню, показують обмежений пасивний ендцитоз і до того ж їм не вистачає деякої рецепторно-опосередкованої здатності до трансцитозу, що зустрічається в інших тканинах. Слід зазначити, що у мишей M6PR опосередковане транспортування через ГЕБ

40 спостерігається тільки до двох тижнів після народження (Urayama et al., Mol Ther 16: 1261-1266 (2008)).

## Глікозилювання ферментів лізосом

У цілому, N-глікозилювання може відбуватися при мотиві послідовності Asn-X-Ser/Thr. До цього мотиву первинна ядерна структура N-глікану передається олігосахарилтрансферазою

45 глікозилтрансферази, в межах ретикулярної формації. Ця загальна основа для всіх N-пов'язаних гліканів складається з 14 залишків: 3 глюкози, 9 манози і 2 N-ацетилглюкозаміну. Цей попередник потім перетворюється на три основних типи N-гліканів: олігоманозний, складний і гібридний (Фігура 7), під впливом множини ферментів, які як зменшують початкове ядро, так і додають нові цукрові компоненти. Кожен зрілий N-глікан містить загальне ядро Man(Man)<sub>2</sub>-GlcNAc-GlcNAc-Asn, де Asn є точкою приєднання до білка.

50

Крім того, білки спрямовані на лізосому, несуть один або кілька N-гліканів, які фосфорилуються. Фосфорилування відбувається в апараті Гольджі і ініціюється додаванням N-ацетилглюкозамін-1-фосфату до C-6 залишків манози N-гліканів типу олігоманоза. N-ацетилглюкозамін відщеплюється для утворення залишків маноза-6-фосфату (M6P), що

55 розпізнаються M6PR, і ініціюється перенесення білка лізосоми в лізосому. Потім одержаний N-глікан переноситься в точку, де M6P є кінцевою групою ланцюга N-глікану. (Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.)

Сайт зв'язування M6PR потребує кінцевої групи M6P, яка є повною, оскільки як цукровий компонент, так і фосфатна група беруть участь у зв'язуванні з рецептором (Kim et al., Curr Opin Struct Biol 19(5):534-42 (2009)).

Ферментозамісна терапія, що діє на головний мозок шляхом модифікації глікану

Потенційна стратегія для збільшення розподілу лізосомного ферменту в ЦНС була описана в публікації WO 2008/109677. У цій опублікованій заявці описується хімічна модифікація  $\beta$ -глюкуронідази з використанням метаперіодату натрію і борогідриду натрію (див. також Grubb et al., Proc Natl Acad Sci USA 105: 2616-2621 (2008)). Ця модифікація, що складається з окислення з використанням 20 мМ періодату натрію протягом 6,5 год., з наступним гасінням, діалізом і відновленням з використанням 100 мМ борогідриду натрію протягом ночі (в подальшому зазначається як "відомий спосіб"), істотно покращила розподіл у ЦНС  $\beta$ -глюкуронідази та призвела до очищення нейронного накопичення в мишачій моделі ЛХН мукополісахаридозу типу VII. Незважаючи на те, що механізм розподілу в головному мозку, який лежить у основі, залишається неясним, було відзначено, що хімічна модифікація розщепила структуру глікану на  $\beta$ -глюкуронідазу, а далі було показано, що рецепторно-опосередкований ендоцитоз M6PR був значно знижений.

Стратегія хімічної модифікації була досліджена для інших лізосомальних ферментів. Наприклад, модифікація відомим способом не покращила розподіл в головному мозку внутрішньовенно введеної протеази трипептиділпептидази I (Meng et al., PLoS One (2012)). Також не було досягнуто жодних задовільних результатів для сульфамідази. Однак, сульфамідаза, хімічно модифікована відомим способом, показала підвищений період напіввиведення у мишей, але жодної дії в головному мозку мишей з мукополісахаридозом типу IIIA. Хімічно модифікована сульфамідаза не розповсюджувалася до паренхіми головного мозку при неодноразовому внутрішньовенному введенні (Rozaklis et al., Exp Neurol 230: 123-130 (2011)).

Таким чином, до цих пір немає ефективної ФЗТ для лікування ЛХН з неврологічним зачепленням, наприклад, мукополісахаридозу типу IIIA. Нові сполуки сульфамідази, які можуть бути перенесені через ГЕБ, залишаючись при цьому ферментативно активними, матимуть велике значення для розвитку сполук, що вводяться системно з метою ферментозамісної терапії для лікування ЛХН з патологією, пов'язаною з ЦНС, наприклад, мукополісахаридозу типу IIIA.

Опис винаходу

Ціллю цього винаходу є створення нових композицій сульфамідази, що дозволить розробити ферментозамісну терапію для таких ЛХН, як МПС (мукополісахаридоз) типу IIIA.

Іншою ціллю даного винаходу є створення нових композицій сульфамідази, які можуть переноситися через гематоенцефалічний бар'єр ссавців і які можуть демонструвати ферментативну (каталітичну) активність в головному мозку зазначеного ссавця.

Ще однією ціллю цього винаходу є створення нових композицій сульфамідази з поліпшеною стабільністю.

Ці та інші цілі, які будуть очевидні фахівцеві в даній галузі з даного опису, досягаються за допомогою різних аспектів даного винаходу, як це визначено в доданій формулі винаходу, і, як правило, розкритих в даному описі.

В одному аспекті цього винаходу, представлена модифікована сульфамідаза, яка не містить по суті епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, таким чином дозволяючи перенесення зазначеної сульфамідази через гематоенцефалічний бар'єр ссавця, де зазначена сульфамідаза має каталітичну активність в головному мозку зазначеного ссавця.

Модифікована сульфамідаза за даним винаходом, таким чином, є модифікованою в тому відношенні, що були видалені епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів, наприклад, у порівнянні з немодифікованою сульфамідазою (Ідентифікаційний номер послідовності SEQ ID NO:1). Як було продемонстровано заявником, наприклад, у наведених прикладах, така модифікована сульфамідаза є менш схильною до клітинного поглинання, яке є наслідком видалення епітопів для таких рецепторів розпізнавання гліканів, як два маноза-6-фосфат-рецептори (M6PR) (див. приклади 6 і 7). Майже повна відсутність зазначених епітопів знижує спорідненість модифікованої сульфамідази по відношенню до рецепторів розпізнавання гліканів. Зокрема, це може привести до зменшення рецепторно-опосередкованого ендоцитозу модифікованої сульфамідази в периферичній тканині, що, в свою чергу, може привести до зменшення кліренсу модифікованої сульфамідази з плазми, наприклад, при внутрішньовенному введенні ссавцю. Це відбувається, ймовірно, принаймні частково через пригнічення рецепторно-опосередкованого поглинання в периферичній тканині після хімічної модифікації сульфамідази (як показано у дослідженнях клітинного поглинання у прикладі 6). З точки зору

дозування, зменшений кліренс модифікованої сульфамідази переважно може забезпечити розробку лікарських засобів тривалої дії, які можуть бути введені пацієнтам рідше.

Під рецепторами розпізнавання гліканів маються на увазі рецептори, які розпізнають і зв'язують білки, в основному, через гліканові фрагменти білків. Такі рецептори можуть, на додаток до маноза-6-фосфат-рецепторів, проілюстровані за допомогою рецептора манози, який вибірково зв'язується з білками, де глікани демонструють відкриті кінцеві залишки манози. Лектини є ще однією великою родиною рецепторів розпізнавання гліканів, які можна представити на прикладі кінцевої галактози, що розпізнає асіалглікопротеїновий рецептор 1, який розпізнає кінцеві залишки галактози на гліканах. Таким чином, епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів можна вважати (частиною) гліканових фрагментів, що розпізнаються такими рецепторами.

У цьому контексті, переважно, модифіковану сульфамідазу, що не містить, по суті, епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів слід розглядати як модифіковану сульфамідазу, яка майже не містить епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, або лише незначні кількості таких епітопів. У переважних варіантах здійснення даного винаходу, модифікована сульфамідаза не містить (помітних) епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів. Зокрема, модифікована сульфамідаза не містить (помітних) фрагментів маноза-6-фосфату, фрагментів манози або фрагментів галактози, що представляють собою епітопи для ендоцитозних M6PR типу 1 і 2, рецептора манози і рецептора галактози відповідно. В одному з варіантів здійснення, зазначені епітопи можуть таким чином бути розпізнані щонайменше одним рецептором розпізнавання гліканів, обраного з M6PR типу 1 і 2, рецептора манози і рецептора галактози. Зокрема, зазначений щонайменше один рецептор розпізнавання гліканів може бути вибраний з M6PR типу 1 і 2. Відповідно до зазначеного вище, зазначені епітопи, які знаходяться на природних фрагментах гліканів, є щонайменше одним типом фрагменту, який вибраний з фрагменту маноза-6-фосфату, фрагменту манози і фрагменту галактози. У конкретних варіантах здійснення, вони відсутні в модифікованій сульфамідазі, як описано у даній заявці.

Крім того, модифікована сульфамідаза відповідно до аспектів, описаних в даному винаході, не тільки поширюється до головного мозку ссавця, але також відображає (збережену) ферментативну активність або каталітичну активність в головному мозку зазначеного ссавця. Ферментативна активність модифікованої сульфамідази зберігається, щонайменше, частково від немодифікованої форми сульфамідази. Крім того, зберігається ферментативна активність в порівнянні до сульфамідази, модифікованої відповідно до способів попереднього рівня техніки, що не відображає (ані розподільної) ферментативної активності в головному мозку мишей. Таким чином, модифікована сульфамідаза, як описано в даному винаході, може вплинути на лізосомальне накопичення в головному мозку ссавців, наприклад, зменшити лізосомальне накопичення, наприклад, лізосомальне накопичення гексозаміна N-сульфату [ $\alpha$ -1, 4] уронової кислоти (HNS-UA), як показано, наприклад, в прикладі 8. Збережена каталітична активність може, наприклад, залежати від ступеня збереження в порівнянні до модифікації каталітичного амінокислотного залишку в активному сайті сульфамідази.

Сульфамідаза належить до родини білків сульфатази. Сульфатази є родиною білків загального еволюційного походження, які каталізують гідроліз сульфатних ефірних зв'язків з різних субстратів. Таким чином, "каталітична активність" модифікованої сульфамідази в контексті даного винаходу може відноситися до гідролізу сульфатних ефірних зв'язків, переважно в лізосомах периферичних тканин і/або в лізосомах в головному мозку ссавця. Таким чином, каталітична активність модифікованої сульфамідази може привести до зниження лізосомального накопичення, такого як накопичення гепарансульфату, в головному мозку ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення. Наприклад, каталітична активність може бути виміряна в тваринній моделі, наприклад, як описано в прикладі 8.

Сульфатази поділяють спільну укладку з центральним  $\beta$ -пластом, який складається з 10  $\beta$ -ланцюгів. Активний сайт сульфамідази знаходиться на кінці центрального  $\beta$ -пласта і містить в собі законсервований цистеїн в положенні 50 послідовності SEQ ID NO:1, яка є посттрансляційно модифікованою в  $\alpha$ -формілгліцин (FGly). Ця реакція відбувається в ендоплазматичному ретикулумі за допомогою фермента, генеруючого FGly. Цей залишок FGly в положенні 50 (FGly50) безпосередньо бере участь в гідролізі сульфатних ефірних зв'язків, і модифікація є необхідною, щоб ферменти були активними. Примітно, що мутація законсервованого цистеїну в серин (Ser) в арилсульфатазі A і B запобігає утворенню FGly і виробляє неактивні ферменти (Recksiek et al., J Biol Chem 13; 273(11):6096-103 (1998)). Коли у цьому документі мова йде про збереження активного сайту, в першу чергу, його слід розуміти як збереження посттрансляційного FGly50 послідовності SEQ ID NO:1. Таким чином, в таких випадках модифіковану сульфамідазу слід розуміти як ту, що включає в себе поліпептид, який

складається з амінокислотної послідовності, як це визначено в SEQ ID NO:1, або амінокислотної послідовності, що має визначену нижче ідентичність послідовностей з такою амінокислотою послідовністю.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений активний сайт містить в собі каталітичний залишок в положенні, що відповідає положенню 50 послідовності SEQ ID NO:1, забезпечуючи згадану каталітичну активність. Цей каталітичний залишок є у наступному варіанті здійснення FGly50.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, модифікована сульфамідаза має відносний вміст природних гліканових фрагментів близько 25 % від вмісту природних гліканових фрагментів в немодифікованій рекомбінантній сульфамідазі. Таким чином, зазначені епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів можуть бути знайдені на природних гліканових фрагментах, а такі природні гліканові фрагменти, таким чином, по суті, відсутні в модифікованій сульфамідазі згідно даного опису. Відносний вміст природних гліканових фрагментів в модифікованій сульфамідазі може в переважних варіантах здійснення дорівнювати менш, ніж 25 %, наприклад, менше 20 %, наприклад, менше 15 %, наприклад, менше 10 %, наприклад, менше 5 %. У конкретному варіанті здійснення, вміст природних гліканових фрагментів становить менше 1 %. Відносний вміст гліканових фрагментів можна розуміти як вміст решти незмінених природних гліканових фрагментів після модифікації сульфамідази. Як показано в доданих прикладах, відносне кількісне визначення глікопептидів може бути основане на рідинній хроматографії з мас-спектрометрією і площах піків з реконструйованих іонних хроматограм. Альтернативні методи кількісного визначення відомі фахівцям в даній галузі. Переважно, відносний вміст природних гліканів на рівні менше 25 % може знизити рецепторно-опосередкований ендоцитоз сульфамідази в клітині за допомогою рецепторів розпізнавання гліканів, а також поліпшити перенесення через гематоенцефалічний бар'єр. Відносний вміст природних гліканів на рівні 25 % можна представити, як буде проілюстровано прикладом нижче, одним природним гліканом. В зв'язку з цим, природні гліканові фрагменти повинні розумітися як гліканові фрагменти, що природньо зустрічаються в сульфамідазі, що були посттрансляційно модифіковані у ендоплазматичному ретикулумі і відсіках Гольджі еукаріотів.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначені природні гліканові фрагменти руйнуються одиночними розривами зв'язків і подвійними розривами зв'язків в зазначеній модифікованій сульфамідазі, в якій переважає руйнування гліканів одиночним розривом зв'язку. Зокрема, природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази руйнуються одиночними розривами зв'язків і подвійними розривами зв'язків, де розмір одиночних розривів зв'язків становить щонайменше 60 % в гліканах олігоманози. У конкретних варіантах здійснення, кількість одиночних розривів зв'язків становить щонайменше 65 %, наприклад, щонайменше 70 %, наприклад, щонайменше 75 %, наприклад, щонайменше 80 %, наприклад, щонайменше 82 %, наприклад, щонайменше 85 % в гліканах типу олігоманози. Кількість одиночних розривів зв'язків в порівнянні до подвійних розривів зв'язків може бути виміряна відповідно до опису в прикладах 10 і 11. Відповідно до опису в інших аспектах даного винаходу, сульфамідазу можна модифікувати шляхом реакції з періодатом таким чином, щоб зруйнувати структуру гліканових фрагментів, що природньо зустрічаються на сульфамідазі. Залишкова гліканова структура модифікованої сульфамідази може бути принаймні частково порушеною в тому сенсі, що щонайменше одне розщеплення, каталізоване періодатом, тобто щонайменше один одиночний розрив зв'язку мав місце в кожному з природних гліканових фрагментів. "Модифікація" зазначеної модифікованої сульфамідази, в порівнянні з немодифікованою сульфамідазою, щонайменше, частково представлена вказаним руйнуванням природних гліканових фрагментів.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, модифікована сульфамідаза містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, як це визначено в SEQ ID NO:1, або поліпептид, що має, щонайменше, 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, як це визначено в SEQ ID NO:1. У не обмежувальному прикладі зазначений поліпептид має, щонайменше, 90 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, як це визначено в SEQ ID NO:1, наприклад, щонайменше 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, як це визначено в SEQ ID NO:1, наприклад, щонайменше 98 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, як це визначено в SEQ ID NO:1. Таким чином, модифікована сульфамідаза за даним винаходом може містити поліпептид, який має амінокислотну послідовність, яка є вельми схожа на послідовність SEQ ID NO:1. Однак, зазначений поліпептид може, наприклад, бути продовжений однією або декількома C- і/або N-кінцевою амінокислотою(-ами), що робить фактичну модифіковану послідовність сульфамідази довшою, ніж послідовність SEQ ID NO:1. Аналогічним чином, в інших випадках модифікована сульфамідаза може мати амінокислотну послідовність, коротшу

від амінокислотної послідовності SEQ ID NO:1, де різниця в довжині, наприклад, обумовлена вилученням(и) амінокислотного(-их) залишку(-ів) в певному(-их) положенні(-ях) послідовності.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначені епітопи відсутні в принаймні чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: аспарагін (N) в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1. Інакше кажучи, зазначена модифікована сульфамідаза містить природні гліканові фрагменти у не більш, ніж одному з зазначених сайтів N-глікозилювання. У деяких варіантах здійснення зазначена модифікована сульфамідаза містить природні гліканові фрагменти в одному із зазначених сайтів N-глікозилювання; зазначений сайт N-глікозилювання, як варіант, може бути N(131). Інакше кажучи, зазначені епітопи, або гліканові фрагменти відсутні в N(21), N(122), N(244) і N(393) зазначеного поліпептиду модифікованої сульфамідази. Переваги такої модифікованої сульфамідази, що не містить гліканових фрагментів у визначених сайтах, пояснювалися вище, тобто можна ще більше зменшити клітинне поглинання і ще більше полегшити перенесення через гематоенцефалічний бар'єр.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначені епітопи відсутні в принаймні чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: аспарагін (N) в положенні 21 (N(21)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)), і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1. Таким чином, немодифікована сульфамідаза може бути природньо глікозильована в цих чотирьох сайтах. Таким чином, у цьому варіанті здійснення винаходу, модифікована сульфамідаза може мати відносний вміст природних гліканових фрагментів в цих положеннях, які дорівнюють близько або менше 25 % від вмісту гліканових фрагментів у відповідних позиціях немодифікованої рекомбінантної сульфамідази. В одному конкретному варіанті здійснення модифікованої сульфамідази, принаймні три з чотирьох природних сайтів глікозилювання, зазначених вище, не мають епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів.

Як вже зазначалося вище, глікановий фрагмент в сайті N-глікозилювання N(131) сульфамідази є глікановим фрагментом, що природньо виникає на немодифікованій рекомбінантній сульфамідазі. Вважається, що N(131) є сайтом глікозилювання на сульфамідазі, який після глікозилювання відповідає за значну частину рецепторно-опосередкованого поглинання в периферичних тканинах у порівнянні з іншими сайтами глікозилювання. Таким чином, руйнування гліканового фрагменту природного походження на N(131) типу олігоманози може впливати на кліренс модифікованої сульфамідази з плазми. Руйнування зазначеного N(131) олігоманози може характеризуватися розміром, що становить принаймні 60 % одиночних розривів зв'язків. Таким чином, руйнування шляхом одиночних розривів зв'язків є частішим, ніж руйнування шляхом подвійних розривів зв'язків.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначені епітопи відсутні в усіх п'яти зазначених сайтах N-глікозилювання модифікованої сульфамідази. Таким чином, гліканові фрагменти відсутні в усіх п'яти сайтах глікозилювання: N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1. Модифікована сульфамідаза, що не має гліканових фрагментів в цих п'яти сайтах, може надалі покращити фармакокінетику модифікованого ферменту, наприклад, в тому відношенні, що може бути додатково знижений кліренс плазми у ссавця. Таким чином, як наслідок, можна також буде зменшити частоту введення модифікованої сульфамідази.

Сульфамідаза людини (EC 3.10.1.1; SEQ ID NO:1) кодується геном SGSH. Сульфамідаза також відома під назвами: сульфамідаза, N-сульфоглюкоз-амін сульфогідролаза, N-сульфоглюкозамін сульфогідролаза, сульфамат сульфогідролаза, гепарансульфат сульфатаза, гепарин сульфамідаза, 2-дезоксі-D-глюкозид-2-сульфамат сульфогідролаза та N-сульфо-D-глюкозамін сульфогідролаза, а використовуваний в даному документі термін "сульфамідаза" слід розуміти як еквівалент цих альтернативних назв.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза є ізольованою.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена сульфамідаза є сульфамідазою людини.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена сульфамідаза перед модифікацією була глікозильована.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза є рекомбінантною. Сульфамідаза може бути одержана рекомбінантним способом, наприклад, як описано в прикладі 1 в цьому документі. Сульфамідаза може бути отримана в еукаріотичних клітинах, прикладами яких, але не обмежуючись цим, є клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), ембріональні клітини нирки людини або лімфоїдні клітинні лінії мишачого походження.

Крім того, сульфамідазу можна одержати в клітинах комах, рослинних клітинах або дріжджових клітинах. Рекомбінантна сульфамідаза людини відома з таких патентів, як № US 5,863,782; US 5,972,333; US 6,200,563; US 6,458,579; і US 6,491,913. Слід розуміти, що для цілей здійснення даного винаходу, сульфамідаза людини може бути одержана способом, описаним в будь-якому з наведених патентів США, які включені в даний опис в якості посилань.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO:1, або поліпептид, який має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з поліпептидом, зазначеним в SEQ ID NO:1, де гліканові фрагменти відсутні в принаймні чотирьох з п'яти сайтах N-глікозилювання: N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1, а зазначена сульфамідаза, як варіант, має непошкоджену с-термінальну частину. В одному з варіантів здійснення даного винаходу, с-термінальна частина, представлена амінокислотами 436-484 послідовності SEQ ID NO:1, є непошкодженою.

В одному аспекті забезпечується композиція сульфамідази, що містить модифіковану сульфамідазу, яка не має, по суті, епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, таким чином, дозволяючи перенесення зазначеної сульфамідази через гематоенцефалічний бар'єр ссавця, і співвідношення Cα-формілгліцину (FGly) до серину (Ser) в активному сайті більше, ніж 1, забезпечуючи тим самим каталітичну активність в головному мозку ссавця. Наприклад, зазначена модифікована сульфамідаза містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO:1, або поліпептид, який має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з поліпептидом, зазначеним в SEQ ID NO:1. В таких прикладах, співвідношення FGly до Ser може розглядатися як співвідношення FGly50 до Ser50. Таким чином, визначене співвідношення означає, що FGly50 присутній в більшій мірі, ніж Ser50. Переважно, співвідношення є більшим, ніж 1,5, більш переважно, більшим, ніж 2,3, ще більш переважно, більшим, ніж 4, і найбільш переважно, співвідношення становить близько 9. Більше співвідношення вказує на те, що каталітична активність модифікованої сульфамідази більшою мірою може бути збережена з незміненої форми сульфамідази.

Переваги композиції, що містить модифіковану сульфамідазу, аналогічні перевагам модифікованої сульфамідази як такої. Таким чином, композиція, що містить модифіковану сульфамідазу, може демонструвати поліпшений період напіврозпаду в плазмі в порівнянні з немодифікованою сульфамідазою або композицією, що містить немодифіковану сульфамідазу. Крім того, зазначена модифікована сульфамідаза може демонструвати поліпшений розподіл в головному мозку ссавця, а також збережену каталітичну активність в головному мозку, в порівнянні, наприклад, з немодифікованою сульфамідазою.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, композиція сульфамідази має відносний вміст природних гліканових фрагментів, що становить близько 25 % від вмісту природних гліканових фрагментів в немодифікованій рекомбінантній сульфамідазі. Таким чином, зазначені епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів можуть бути знайдені на природних гліканових фрагментах, а також такі природні гліканові фрагменти, таким чином, по суті, відсутні в композиції сульфамідази згідно з даним описом. Композиція модифікованої сульфамідази, де відносний вміст природних гліканових фрагментів композиції як такої становить близько 25 %, може, наприклад, бути представлена композицією модифікованої сульфамідази, де кожна сульфамідаза містить один природний глікан, наприклад, один природний глікановий фрагмент в одному з раніше згаданих сайтів N-глікозилювання. Відносний вміст природних гліканових епітопів в сполучі сульфамідази може становити в першачних варіантах здійснення менше 20 %, менше 15 %, менше 10 %, менше 5 %. У деяких випадках, відносний вміст природних гліканових фрагментів становить менше 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, наприклад, менше 0,1 %, наприклад, менше 0,01 %. Композиція сульфамідази, що має відносний вміст природних гліканових фрагментів на цих рівнях, є композицією, в якій можуть бути знайдені тільки слідові кількості природних гліканових фрагментів. Таким чином, композиція є сумішшю модифікованих сульфамідаз, в яких природні гліканові фрагменти більш-менш зруйновані. У конкретному варіанті здійснення, вміст природних гліканових фрагментів становить менше 1 %. Відносний вміст природних гліканів на рівні близько або менше 25 %, переважно може знизити рецепторно-опосередкований ендоцитоз сульфамідази в клітини за допомогою рецепторів розпізнавання гліканів, а також поліпшити перенесення через гематоенцефалічний бар'єр.

В одному конкретному варіанті здійснення аспекту композиції, зазначені епітопи відсутні в принаймні чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: аспарагін (N) в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1, переважно, зазначені епітопи відсутні в сайтах N(21),



N(122), N(244) і N(393). Інакше кажучи, зазначена модифікована сульфамідаза композиції містить природні гліканові фрагменти у не більш, ніж одному з зазначених сайтів N-глікозилювання, як варіант, в N(131).

В одному з варіантів здійснення даного аспекту композиції, не більше 5 % (масової частки) зазначеної модифікованої сульфамідази присутні в мультимірних формах, що мають молекулярну масу близько  $10^{10}$  кДа.

В одному з варіантів здійснення даного аспекту композиції, не більше 5 % (масової частки) зазначеної модифікованої сульфамідази присутні в олігомерних формах, причому зазначені олігомерні форми мають молекулярну масу від 180 до 480 кДа. Присутність олігомерних, мультимерних або агрегованих форм можна визначити, наприклад, за допомогою динамічного розсіювання світла або за допомогою гель-фільтраційної хроматографії. У цьому контексті, агреговані форми слід розуміти як високомолекулярні білкові форми, що складаються з структур від природньо згорнутих до розгорнутих мономерів. Агреговані білкові форми можуть посилювати імунну відповідь на мономерну білкову форму. Найбільш вірогідним поясненням посиленої імунної відповіді є те, що полівалентні презентації антигену мають поперечний молекулярний зв'язок з рецепторами В-клітин і, таким чином, викликають імунну відповідь. Це явище було використано у виробництві вакцин, де антиген вводиться носієм в агрегированій формі, щоб забезпечити високу імунну відповідь. У випадку терапевтичних білків догма є протилежною; будь-який вміст високомолекулярних форм необхідно звести до мінімуму або уникати його, щоб звести до мінімуму імунну відповідь (Rosenberg, AAPS J, 8:E501-7 (2006)). Таким чином, зниження олігомерних, мультимерних і/або агрегованих форм може забезпечити фермент, який більше підходить для застосування в терапії.

Іншим аспектом агрегації є те, що поява навіть невеликої кількості в зразку може викликати агрегацію зазвичай згорнутих білків. Агрегований матеріал зазвичай не має або має низьку залишкову активність і низьку розчинність. Поява агрегатів може бути одним з факторів, що визначають термін зберігання біологічного медикаменту (Wang, Int J Pharm, 185:129-88 (1999)).

Термін "композиція" в контексті даного винаходу слід розуміти як термін, що охоплює тверді і рідкі форми. Переважно, композиція може бути фармацевтичною композицією, придатною для введення пацієнту (наприклад, ссавцеві), наприклад, шляхом ін'єкції або перорально.

Крім того, слід розуміти, що варіанти здійснення винаходу і їх переваги, описані в зв'язку з аспектами модифікованої сульфамідази, є також варіантами здійснення аспекту композиції. Так само, варіанти здійснення аспекту композиції також слід розглядати як варіанти здійснення аспектів модифікованої сульфамідази у відповідних випадках.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза або зазначена композиція сульфамідази призначена для застосування в терапії.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений головний мозок ссавця є головним мозком людини. Таким чином, у поблиському варіанті здійснення, зазначений ссавець є людиною.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений головний мозок ссавця є головним мозком миші. Таким чином, у поблиському варіанті здійснення, зазначений ссавець є мишею.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза або зазначена композиція сульфамідази призначена для застосування в лікуванні ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення, зокрема, від мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA).

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначена модифікована сульфамідаза або зазначена композиція сульфамідази, призначена для застосування, знижує накопичення гепарансульфату в головному мозку зазначеного ссавця. Зокрема, зазначене накопичення гепарансульфату знижується принаймні на 30 %, наприклад, у тваринній моделі, наприклад, принаймні на 35 %, принаймні на 40 % або принаймні на 50 %.

В одному аспекті даного винаходу була запропонована модифікована сульфамідаза, де вказана сульфамідаза була одержана шляхом послідовної реакції з періодатом лужного металу і боргідридом лужного металу, тим самим змінюючи епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів сульфамідази і знижуючи активність сульфамідази щодо згаданих рецепторів розпізнавання гліканів, при збереженні каталітичної активності зазначеної сульфамідази. Таким чином, сульфамідаза є модифікованою в тому сенсі, що її епітопи або гліканові фрагменти, присутні в її природній, глікозилюваній формі до модифікації, були істотно деактивовані зазначеною модифікацією. Таким чином, у модифікованій сульфамідазі була зменшена присутність епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів. Слід розуміти, що варіанти здійснення винаходу і їх переваги, описані в зв'язку з іншими аспектами, розкритими в

даному документі, наприклад, аспектами, пов'язаними з модифікованою сульфамідазою, композицією і способом одержання, є також варіантами здійснення цього аспекту. Зокрема, різні варіанти здійснення способу, описані нижче, забезпечують ще один приклад визначення одержання зазначеної модифікованої сульфамідази з точки зору конкретних умов реакції.

Аналогічним чином, варіанти здійснення, описані по відношенню до модифікованої сульфамідази, і вищезазначені аспекти композиції забезпечують ще один приклад визначення модифікованої сульфамідази.

В одному аспекті даного винаходу запропоновано спосіб одержання модифікованої сульфамідази, причому зазначений спосіб включає: а) реакцію глікозильованої сульфамідази з періодатом лужного металу, і б) взаємодію зазначеної сульфамідази з боргідридом лужного металу протягом не більше 2 годин; тим самим змінюючи гліканові фрагменти сульфамідази і знижуючи активність сульфамідази по відношенню до згаданих рецепторів розпізнавання гліканів, при збереженні каталітичної активності зазначеної сульфамідази. Зазначений боргідрід, як варіант, використовується в концентрації від 10 до 80 мМ, наприклад, в концентрації від 10 до 80 мМ.

Таким чином, наведений вище спосіб забезпечує легку хімічну модифікацію сульфамідази, що знижує присутність епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, де зазначені епітопи, наприклад, представлені природними глікановими фрагментами згідно з даним описом. Це переважно може забезпечити модифіковану сульфамідазу, відповідну для направленої взаємодії з головним мозком ссавця. Крім того, м'який спосіб модифікує зазначені епітопи без істотної зміни каталітичної активності сульфамідази. Зокрема, каталітична активність може бути збережена шляхом збереження FGly50 в активному сайті сульфамідази. Таким чином, при одночасному поліпшенні властивостей розподілу ферменту, спосіб не виключає каталітичну активність. Додаткові переваги модифікованої сульфамідази, одержаної м'яким способом, описані вище, наприклад, для сульфамідази і аспектів композицій.

Спосіб дозволяє модифікувати глікан шляхом періодатного розщеплення вуглецевих зв'язків між двома сусідніми гідроксильними групами гліканових (вуглеводних) фрагментів. Загалом, періодатне окисне розщеплення відбувається там, де присутні віцинальні діоли. Діоли повинні бути присутніми в екваторіально-екваторіальному або аксиально-екваторіальному положенні. Якщо діоли відсутні в жорсткому аксиально-аксиальному положенні, не відбувається жодна реакція (Kristiansen et al, Car. Res (2010)). Обробка періодатом зруйнує зв'язок між C2 і C3 і/або C3 і C4 фрагменту M6P, отримуючи, таким чином, структуру, яка не здатна зв'язуватися з M6P-рецептором. Загалом, інші кінцеві гексози також будуть оброблені аналогічним чином. Нетермінальні 1-4 зв'язані залишки розщеплюються тільки між C2 і C3, в той час як нетермінальні (1-3) зв'язані залишки є стійкими до розщеплення. На Фігурі 7 точки можливої модифікації позначені зірочкою у трьох загальних типах N-гліканів; олігоманозний, складний і гібридний. Як додатково показано на доданих Фігурах 8-10, спосіб згідно з даним описом забезпечує модифіковану сульфамідазу, де природні гліканові фрагменти були зруйновані в результаті обмеженого числа розривів зв'язків в порівнянні з сульфамідазою, модифікованою відповідно до раніше відомих способів. Спосіб, що описується, в основному, призводить до однотипних розривів зв'язків в цукрових фрагментах гліканових фрагментів сульфамідази (див. Фіг. 8). Часткове окиснення глікану з переважно одиночними розривами зв'язків в цукрових фрагментах гліканових фрагментів є типовим для відносно м'яких способів хімічної модифікації, описаних в даному документі. Для одержання сульфамідази з частковим глікановим окисненням і переважно одиночними розривами зв'язків в цукрових фрагментах гліканових фрагментів можна використати умови, описані нижче і показані в Прикладі 4.

Спосіб одержання модифікованої сульфамідази і модифікованої сульфамідази згідно з даним описом поліпшено в порівнянні з раніше відомими способами і сполуками. В першу чергу, автори винаходу несподівано виявили, що нова модифікована сульфамідаза розподіляється і відображає каталітичну активність в головному мозку ссавців. Крім того, Приклади 3 і 5 дають порівняння між відомими способами і сульфамідазами та способами і сульфамідазами, описаними в даному винаході. Результати, наведені в цих прикладах, показують, що сульфамідаза, модифікована відповідно до відомих способів, містить модифікації амінокислотних залишків і демонструє розщеплення поліпептидного ланцюга і агрегацію білка. Особливий інтерес представляє спостережуване перетворення каталітичного FGly залишку в залишок Ser в активному сайті сульфамідази, модифікованої відповідно до попереднього способу. Відносно коротка тривалість стадії зниження в новому способі, здається, позитивно впливає на каталітичну активність модифікованого ферменту.

В одному з варіантів здійснення аспекту даного способу, зазначений глікозильований поліпептид сульфамідази містить гліканові фрагменти, щонайменше, в чотирьох залишках аспарагіну (сайти N-глікозилювання).

В одному з варіантів здійснення аспекту даного способу, зазначеними глікозильованими залишками аспарагіну є: N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 131 (N(131)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) послідовності SEQ ID NO:1. Таким чином, ці сайти N-глікозилювання відповідають природним глікановим фрагментам.

В одному з варіантів здійснення аспекту даного способу, зазначений періодат лужного металу окислює *cis*-глікольні групи гліканових фрагментів до альдегідних груп.

В одному з варіантів здійснення аспекту даного способу, зазначений боргідрид лужного металу перетворює зазначені альдегіди в спирти.

В одному з варіантів здійснення аспекту даного способу, стадія а) і стадія b) виконуються послідовно без виконання проміжної стадії. Автори даного винаходу виявили, що стадія b) можна виконувати відразу після стадії а), або після необов'язкової стадії гасіння а2) згідно з нижченаведеним описом, тим самим виключивши проміжну стадію з видалення реактивних реагентів, наприклад, шляхом діалізу, ультрафільтрації, осадження або зміни буфера і, таким чином, уникаючи тривалої експозиції сульфамідази дії проміжних продуктів реактивних альдегідів. Виконання стадії b) після стадії а) або, як варіант, а2), також переважно знижує загальну тривалість реакції.

Нижче описуються конкретні варіанти здійснення стадії а). Слід розуміти, що, якщо не зазначено інакше, конкретні варіанти здійснення аспектів, розкритих у даному документі, можуть бути об'єднані.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат лужного металу є метаперіодатом натрію.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначену реакцію на стадії а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад, не більше 3 годин, наприклад, не більше 2 годин, наприклад, не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години. У деяких варіантах здійснення, реакцію з стадії а) виконують протягом щонайменше 0,5 години. Реакція переважно триває близько 3 години, 2 години, 1 годину або менше 1 години. Автори даного винаходу виявили, що тривалість стадії а) протягом не більше 4 годин ефективно інактивує епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів. Крім того, тривалість не більше 4 годин до сих пір призводить до зниження ступеня розривів ланцюгів поліпептидного ланцюга в порівнянні зі ступенем розривів ланцюгів, які спостерігаються у випадку сульфамідази, одержаної відповідно до відомих способів. Це було продемонстровано авторами даного винаходу, наприклад, в Прикладі 4 і 5.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат використовується в (кінцевій) концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ. Періодат може бути використаний в концентрації 8-20 мМ, переважно близько 10 мМ. В якості альтернативи, періодат використовується в концентрації менше 20 мМ, наприклад, від 10 до 19 мМ. Було виявлено, що більш низька концентрація періодату лужного металу, такого як метаперіодат натрію, зменшує ступінь розривів ланцюгів поліпептидного ланцюга, а також супутнє окислення на бічних ланцюгах амінокислоти, наприклад, окислення метіонінового залишку в положенні 226 послідовності SEQ ID NO:1 (Met226).

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначену реакцію на стадії а) здійснюють при температурі навколишнього середовища, і, переважно, при температурі від 0 до 22 °C. У переважному варіанті здійснення даного винаходу, реакцію на зазначеній стадії а) здійснюють при температурі 0-8 °C, наприклад, при температурі 0-4 °C. У переважному варіанті здійснення даного винаходу, реакцію на стадії а) здійснюють при температурі близько 8 °C, при температурі близько 4 °C або при температурі близько 0 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначену реакцію на стадії а) здійснюють при pH від 3-7. Це значення pH слід розуміти як pH на початку реакції. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, pH, що використовується на стадії а), дорівнює від 3-6, наприклад, від 4-5. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, pH, що використовується на стадії а), становить близько 6, близько 5 або близько 4. При зниженні pH на стадії а) концентрація періодату або час реакції на стадії а) можуть бути зменшені.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію і використовується в (кінцевій) концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ. В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений метаперіодат натрію використовується в концентрації 8-20 мМ. У переважних варіантах

здійснення даного винаходу, метаперіодат натрію використовується в концентрації близько 10 мМ.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію і використовується в (кінцевій) концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад, не більше 3 годин, наприклад, не більше 2 годин, наприклад, не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години. Таким чином, у порівнянні з відомими способами, концентрація періодату 20 мМ і тривалість реакції не більше 4 годин можуть привести до меншого розриву ланцюгів і окислення. Подальше зменшення концентрації періодату при збереженні відносно короткої тривалості реакції позитивно впливає на подальші розриви ланцюгів і окислення. Концентрація менше 20 мМ приводить до ще меншого розриву ланцюгів і окислення, і концентрація не більше 15 мМ приводить до ще меншого розриву ланцюгів і окислення, а також концентрація близько 10 мМ приводить до найменшого розриву ланцюгів і окислення. Як показано в Прикладі 5, модифікована сульфамідаза відповідно до аспектів, описаних в даному винаході, показує менший розрив ланцюгів, особливо в с-термінальній частині сульфамідази, як це представлено, наприклад, амінокислотами 436-484 послідовності SEQ ID NO:1. Виявилось, що ця с-термінальна частина є неушкодженою в сульфамідазі, одержаній згідно з даним описом. Крім того, окислення метіоніну в положенні 226 (Met226) є рідшим.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію і використовується в (кінцевій) концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад, не більше 3 годин, наприклад, не більше 2 годин, наприклад, не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години при температурі від 0 до 22 °С, наприклад, близько 8 °С, наприклад, близько 0 °С.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат використовується в концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад, не більше 3 годин, наприклад, не більше 2 годин, наприклад, не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години при температурі від 0 до 22 °С, наприклад, при температурі від 0 до 8 °С, наприклад, при температурі від 0 до 4 °С, наприклад, близько 8 °С, наприклад, близько 0 °С.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію, а зазначену реакцію на стадії а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад, не більше 3 годин, наприклад, не більше 2 годин, наприклад, не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години при температурі від 0 до 22 °С, наприклад, при температурі від 0 до 8 °С, наприклад, при температурі від 0 до 4 °С, наприклад, близько 8 °С, наприклад, близько 0 °С.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію, який використовується в концентрації максимум 20 мМ, наприклад, максимум 15 мМ, наприклад, близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують при температурі від 0 до 22 °С, наприклад, при температурі від 0 до 8 °С, наприклад, при температурі від 0 до 4 °С, наприклад, близько 8 °С, наприклад, близько 0 °С.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію, який використовується в концентрації близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують при температурі близько 8 °С і протягом максимум 2 годин.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію, який використовується в концентрації близько 10 мМ, а зазначену реакцію на стадії а) виконують при температурі від 0 до 8 °С і протягом не більше 3 годин.

Нижче описуються конкретні варіанти здійснення стадії b). Слід розуміти, що, якщо не зазначено інакше, конкретні варіанти здійснення можуть бути об'єднані, зокрема, конкретні варіанти здійснення стадії а) та стадії b).

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію.

У деяких випадках було виявлено, що умови, які використовуються для стадії b), частково залежать від умов, які використовуються для стадії а). У той час як кількість боргідриду, що використовується на стадії b), переважно утримується настільки низькою, наскільки це можливо, молярне відношення боргідриду до періодату в таких випадках дорівнює 0,5-4 до 1. Таким чином, боргідрид на стадії b) можна використовувати в молярному надлишку, що в 4 рази перевищує кількість періодату, використаного на стадії а). В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид використовується в (кінцевій) молярній концентрації, що

не більше, ніж в 4 рази, перевищує (кінцеву) концентрацію зазначеного періодату. Наприклад, боргідридо можна використати в концентрації, що не більше, ніж в 3 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, не більше, ніж в 2,5 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, не більше, ніж в 2 рази, перевищує  
 5 концентрацію зазначеного періодату, наприклад, не більше, ніж в 1,5 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що приблизно відповідає концентрації зазначеного періодату. Однак, в конкретних варіантах здійснення, боргідрид використовується в концентрації, що відповідає половині концентрації періодату, або в 0,5 рази перевищує концентрацію періодату. Таким чином, коли періодат використовується в  
 10 концентрації близько 20 мМ, боргідрид можна використовувати в концентрації не більше 80 мМ, або навіть в концентрації від 10 до 80 мМ, наприклад, в концентрації від 10 до 50 мМ. Якщо періодат використовується в концентрації від 10 до 20 мМ, боргідрид можна використати в концентрації від 25 до 80 мМ, наприклад, 50 мМ. Так само, якщо періодат використовується в концентрації близько 10 мМ, боргідрид можна використовувати в концентрації не більше 40 мМ,  
 15 наприклад, не більше 25 мМ. Крім того, в такому варіанті здійснення, боргідрид переважно може бути використаний в концентрації від 12 мМ до 50 мМ. Автори даного винаходу виявили, що концентрація боргідриду впливає на ступінь збереження каталітичного залишку амінокислоти в активному сайті сульфамідази, і, таким чином, відносно низька концентрація боргідриду може забезпечити модифіковану сульфамідазу зі збереженням каталітичної активності.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначену реакцію на стадії b) здійснюють протягом періоду часу, що дорівнює не більше 1,5 години, наприклад, не більше 1 години, наприклад, не більше 0,75 години, наприклад, близько 0,5 години. Тривалість реакції переважно становить близько 1 години або менше 1 години. У деяких випадках реакція на стадії b) триває  
 20 близько 0,25 години. В інших варіантах здійснення реакція на стадії b) може бути здійснена протягом періоду часу від 0,25 години до 2 годин. Як зазначалося вище, було виявлено, що тривалість стадії відновлення впливає на каталітичну активність сульфамідази. Таким чином, відносно коротка тривалість реакції може забезпечити модифіковану сульфамідазу, що включає FGly50 замість Ser50. Крім того, було виявлено, що більш коротка тривалість реакції сприятливо впливає на загальну структурну цілісність ферменту. Зокрема, здається, що  
 30 агрегація білка, що призводить до високомолекулярних форм сульфамідази, а також поява розривів ланцюгів принаймні частково пов'язані з часом реакції. Таким чином, відносно коротка тривалість реакції на стадії b) може зменшити виникнення агрегатів, а також розривів ланцюгів. Як пояснюється в іншому місці в цьому тексті, зменшена присутність агрегованих форм може надати білок, більш відповідний для використання в терапії.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначену реакцію на стадії b) здійснюють при температурі від 0 до 8 °C. Було виявлено, що температура реакції на стадії b) принаймні частково впливає на каталітичну активність продукту реакції. Зокрема, перетворення каталітичного залишку в активному сайті сульфамідази пов'язане з температурою реакції. Таким чином, можливо, краще виконувати стадії b) при температурі нижче 8 °C. Переважно,  
 40 температура дорівнює близько 0 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, який використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, який використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють протягом періоду часу, що дорівнює не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, який використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють протягом періоду часу, що дорівнює не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години, при  
 55 температурі від 0 до 8 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють протягом періоду часу, що  
 60 дорівнює не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години, при температурі від 0 до 8 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють протягом періоду часу, що дорівнює не більше 1 години, наприклад, близько 0,5 години, при температурі від 0 до 8 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, який використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють при температурі від 0 до 8 °C.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію, який використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад, в концентрації, що максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, а зазначену реакцію на стадії b) здійснюють при температурі близько 0 °C протягом періоду часу, що дорівнює близько 0,5 години.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений періодат є метаперіодатом натрію, а зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, кожна зі стадії a) і стадії b) окремо виконується протягом періоду часу, що не перевищує 2 години, наприклад, не перевищує 1 години, наприклад, дорівнює близько 1 години або близько 0,5 години. Як варіант, зазначений боргідрид використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, переважно в 0,5-2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату. У деяких варіантах здійснення, зазначений боргідрид використовується в концентрації, що в 0,5 рази перевищує концентрацію періодату, або в концентрації, що в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, стадія a) виконується протягом періоду часу, що не перевищує 3 години, а стадія b) виконується протягом періоду часу, що не перевищує 1 години. Як варіант, зазначений боргідрид використовується в концентрації, що максимум в 4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, переважно максимум в 2,5 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату.

Фахівцю в даній галузі відомі способи регулювання тривалості хімічної реакції, наприклад, тривалості реакції кожного стадії a) і b). Таким чином, в одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений аспект способу додатково містить стадію a2) гасіння реакції, що витікає зі стадії a). Зазначене гасіння триває, наприклад, менше 30 хвилин, наприклад, менше 15 хвилин. У деяких випадках, зазначене гасіння виконується безпосередньо після стадії a). Гасіння може, наприклад, бути виконане шляхом додавання етиленгліколю. Етиленгліколь може бути доданий до кінцевої концентрації 192 мМ. Переважно, стадія b) йде безпосередньо після гасіння. Це може звести до мінімуму період впливу на сульфамідазу реактивних альдегідних груп. Реактивні альдегіди можуть сприяти інактивації та агрегації білка.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, зазначений спосіб додатково містить стадію b2) гасіння реакції, що витікає зі стадії b). Це гасіння, наприклад, може бути проведене шляхом додавання молекули, що містить кетоніву або альдегідну групу, наприклад, циклогексанон або ацетон, де зазначена молекула переважно є розчинною у воді. Альтернативно, вказане гасіння може бути здійснено шляхом зниження рівня рН нижче 6 реакційної суміші шляхом додавання оцтової кислоти або іншої кислоти. У деяких випадках, вказане гасіння здійснюється шляхом додавання ацетону до кінцевої концентрації близько 0,1 М. Необов'язкова стадія гасіння дозволяє точно контролювати тривалість реакції на стадії b). Таким чином, контроль тривалості реакції може додатково забезпечувати відтворюваність процесу з точки зору вмісту FGly50.

Таким чином, описаний в даному винаході спосіб забезпечує модифіковану сульфамідазу, яка має ряд переваг в порівнянні з сульфамідазою, модифікованою відповідно до попереднього рівня техніки. Таким чином, автори даного винаходу виявили умови для хімічної модифікації сульфамідази з мінімальним негативним впливом на структурну цілісність сульфамідази поліпептидного ланцюга, що одночасно призводить до істотної відсутності природних гліканових структур, які передбачають майже повну модифікацію гліканів у всіх чотирьох природних центрах глікозилювання, зберігаючи при цьому каталітичну активність. Несподівано, на конкретному прикладі було виявлено, що умови, які використовуються для стадії a), сприяють умовам для виконання стадії b). Прикладові варіанти здійснення даного способу показані на фігурах 1B, 1C та 1D.

В одному аспекті запропоновано модифіковану сульфамідазу, одержану за допомогою способу відповідно до вищезазначеного аспекту способу.

В одному аспекті запропоновано модифіковану сульфамідазу, одержану відповідно до описаного вище аспекту способу для застосування в терапії.

В одному аспекті запропоновано модифіковану сульфамідазу, одержану відповідно до описаного вище аспекту способу для застосування в лікуванні лізосомної хвороби накопичення, зокрема, мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA).

В одному аспекті запропоновано використання модифікованої сульфамідази у виробництві лікарського засобу для перенесення через гематоенцефалічний бар'єр для лікування лізосомної хвороби накопичення, наприклад, мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA), в головному мозку ссавців, де зазначена модифікація включає гліканові фрагменти, хімічно модифіковані шляхом послідовної обробки ферменту періодатом лужного металу і боргідридом лужного металу, тим самим знижуючи активність сульфамідази по відношенню до рецепторів розпізнавання гліканів, таких як маноза і маноза-6-фосфат клітинні системи доставки, зберігаючи при цьому каталітичну активність зазначеної сульфамідази.

В одному аспекті пропонується спосіб лікування ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення, наприклад, мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA), що включає введення ссавцю терапевтично ефективної кількості модифікованої сульфамідази, де зазначена модифікована сульфамідаза обирається з:

а) модифікованої сульфамідази, що описана в аспектах і варіантах здійснення даного винаходу;

б) композиція сульфамідази, що описана в аспектах і варіантах здійснення даного винаходу;

в) модифікованої сульфамідази, де зазначена модифікація містить послідовну обробку вказаної модифікованої сульфамідази періодатом лужного металу і боргідридом лужного металу, де сульфамідаза має гліканові фрагменти, хімічно модифіковані з метою зниження активності сульфамідази по відношенню до рецепторів розпізнавання гліканів, таких як маноза і маноза-6-фосфат клітинні системи доставки, зберігаючи при цьому каталітичну ферментативну активність.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, вказане лікування призводить до кліренсу приблизно щонайменше 48 % лізосомного накопичення з головного мозку ссавця після введення 10 доз модифікованої сульфамідази протягом 70 днів. Крім того, вказане лікування призводить до кліренсу приблизно щонайменше 30 % лізосомного накопичення з головного мозку ссавця після введення 13 доз модифікованої сульфамідази протягом 25 днів.

Додатково винахід буде проілюстровано наступними необмежуваними прикладами.

Короткий опис Фігур

На Фігурі 1 показане зображення, що відображає різниці між способами хімічної модифікації, розробленими авторами даного винаходу, описаними в Прикладі 4, і відомим способом, описаним в публікації WO 2008/109677.

На Фігурі 2А показаний ДСН-ПААГ-електрофорез (електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію) для сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу. Були визначені чотири смуги білка, позначені 1-4, утворені в процесі модифікації глікану.

На Фігурі 2В показаний ДСН-ПААГ-електрофорез як для сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу, так і для сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1, описаного в даному винаході.

На Фігурі 3А показана хроматограма гель-проникної хроматографії сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу.

На Фігурі 3В показана хроматограма гель-проникної хроматографії сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1, описаного в даному винаході. Стрілкою позначено кількість багатомірних форм модифікованої сульфамідази.

На Фігурі 4А показана інтенсивність розсіювання, яка вимірюється шляхом динамічного світлорозсіювання сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу.

На Фігурі 4В показана інтенсивність розсіювання, яка вимірюється шляхом динамічного світлорозсіювання сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1, описаного в даному винаході.

На Фігурі 5 представлена діаграма, що візуалізує рецепторно-опосередкований ендоцитоз в клітинах MEF-1 (фібробласт ембріона миші) немодифікованої рекомбінантної сульфамідази, сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу, і сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1 і 2, описаних в даному винаході.

На Фігурі 6А представлені результати лікування in vivo мишей, що страждають від МПС IIIA. Діаграма відображає кліренс гепарансульфатного накопичення в головному мозку мишей після

внутрішньовенного введення через день (13 доз) сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1 дозою 30 мг/кг.

На Фігурі 6В представлені результати лікування *in vivo* мишей, що страждають від МПС IIIA. Діаграма відображає кліренс гепарансульфатного накопичення у печінці мишей після внутрішньовенного введення через день (13 доз) сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1 дозою 30 мг/кг.

На Фігурі 6С представлені результати лікування *in vivo* мишей, що страждають від МПС IIIA. Діаграма відображає кліренс гепарансульфатного накопичення в головному мозку мишей після внутрішньовенного введення один раз на тиждень (10 доз) сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1 дозою 30 мг/кг і 10 мг/кг, відповідно.

Фігура 7 є схематичним зображенням трьох архетипових N-гліканових структур, зазвичай присутніх в білках. Лівий глікан представляє олігоманозний тип, середній - комплексний тип, а правий - гібридний тип. На Фігурі зображені такі сполуки: замальовані чорним ромби відповідають N-сіаловій кислоті; замальовані чорним кружки відповідають манозі; квадрати відповідають N-ацетилглюкозамінові; замальований чорним трикутник відповідає фукозі; кружок відповідає галактозі. Цукрові фрагменти, помічені зірочкою, можуть бути модифіковані шляхом обробки періодатом/борогідридом, відповідно до даного опису.

Фігура 8А є схематичним зображенням, що ілюструє передбачені розриви зв'язків на манозі після хімічної модифікації.

Фігура 8В є схематичним зображенням, що ілюструє модель Man-6 глікану. Зазначено цукрові фрагменти, які ймовірно з'єднують розриви після окислення періодатом. Сірі кружки відповідають манозі, чорні квадрати відповідають N-ацетилглюкозамінові, T13 відповідає триптичному пептидові N1TR з включеним сайтом N-глікозилування N(131).

Фігура 9 є мас-спектрами двозарядних іонів, що відповідають триптичному пептидові T13 з Man-6 гліканом, прикріпленим до N (131) (T13+Man-6 глікан), до (A) і після хімічної модифікації (B-D) відповідно до раніше відомого способу (S. = одиночні розриви зв'язків; D. = подвійні розриви зв'язків; наприклад, D.x3=3 подвійні розриви зв'язків).

На Фігурі 10А представлена діаграма, що візуалізує ступінь розривів зв'язків триптичного пептиду T13+Man-6 глікану після хімічної модифікації відповідно до раніше відомого способу (чорна риска), нового способу 1 (чорні точки), нового способу 3 (білі) і нового способу 4 (хрестики).

На Фігурі 10В представлена діаграма, що візуалізує відносну розповсюдженість одиночних розривів зв'язків у триптичному пептиді T13+Man-6 глікані після хімічної модифікації відповідно до раніше відомого способу (чорна риска), нового способу 1 (чорні точки), нового способу 3 (білі) і нового способу 4 (хрестики).

Фігура 11 є таблицею з переліком амінокислотних послідовностей сульфамідази людини, де послідовність SEQ ID NO:1 відповідає амінокислотній послідовності сульфамідази людини, SEQ ID NO:2 відповідає GS-сульфамідазі, а SEQ ID NO:3 відповідає сульфамідазі-GS.

#### Приклади

Наведені нижче приклади описують процес одержання поліпептиду модифікованої сульфамідази відповідно до даного винаходу.

#### Приклад 1:

Вирощування, очищення та дослідження сульфамідази

Матеріал і способи

Побудова векторів експресії для сульфамідази: Синтетичні гени, що кодують сульфамідазу людини, були синтезовані за допомогою Geneart (Life Technologies), обидва в кодон-оптимізованих версіях для *H. sapiens* або *S. griseus* (клітини CHO (клітини яєчника китайського хом'ячка)) та оригінальної послідовності людини. Синтетичні гени були клоновані в різних векторах експресії ссавців, наприклад, pcDNA3.1(+) (Invitrogen) або pQMCF1 (Icosagen).

Одержання сульфамідази: Дві перехідні системи експресії були оцінені відносно одержання сульфамідази, перехідна експресія у клітинах нирки ембріона людини HEK293 з використанням векторів pcDNA3.1(+) та епісомальна система експресії Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) з використанням вектора pQMCF1. В обох системах клітини вирощували в стандартному середовищі, а секретований білок збирали, як правило, через 6-8 днів після трансфекції. Крім того, лінію стабільних клітин, яка була створена з використанням комерційно доступної системи експресії CHO, оцінювали з точки зору одержання сульфамідази.

Сульфамідаза була захоплена з середовища за допомогою аніонообмінної хроматографії на колонці Q-сефарози (GE Healthcare), врівноважена за допомогою 20 mM Tris (трис), 1 mM EDTA (етилендіамінтетраоцтової кислоти), pH 8,0 та вимита градієнтом NaCl (хлорида натрію). Потім захоплену сульфамідазу очистили шляхом меркапто-етил-піридин-хроматографії;



сульфамідазу, що містить частки, завантажували в хроматографічну колонку MEP HyperCel, і потім вимивали за допомогою ізократичного елювання в 50 mM NaAc (ацетата натрію), 0,1 M NaCl (хлориду натрію), 1 mM EDTA (етилендіамінтетраоцтової кислоти), 1 mM DTT (дітіотреїтолу), pH 4,6. Остаточне полірування було досягнуте за допомогою катіонообмінної хроматографії на колонці SP-сефарози FF (GE Healthcare), врівноваженої в 25 mM NaAc, 2 mM DTT (дітіотреїтолу), pH 4,5. Для вимивання застосовували градієнт NaCl. Чистоту та ідентичність партій сульфамідази з різних систем експресії аналізували за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу та часопротітної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці, дані не показані.

Аналіз глікозилювання: Профіль глікозилювання був визначений для різних одержаних партій сульфамідази. Перед глікопептидним аналізом, сульфамідаза (близько 10  $\mu$ г мкг) була відновлена, алкілована та розщеплена трипсином. Відновлення білку відбувалося шляхом інкубації в 5  $\mu$ г мкг DTT (дітіотреїтолу) 10 mM в 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  при 70 °C протягом 1 години. Подальше алкілювання за допомогою 5  $\mu$ г мкл йодацетаміда 55 mM в 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  виконувалося при кімнатній температурі (КТ) і в темряві протягом 45 хв. І, нарешті, розщеплення трипсином здійснювали шляхом додавання 30  $\mu$ г мкл 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8, та 0,2 мкг/мкл трипсина в 50 mM оцтової кислоти (протеаза: співвідношення білка 1:20 (масова частка)). Розщеплення виконувалося протягом ночі при 37 °C.

П'ять пептидних фрагментів сульфамідази, розщепленої трипсином, містили потенційні сайти N-глікозилювання. Цими пептидними фрагментами, що містять потенційні сайти глікозилювання N(x), де x позначає положення аспарагіну в амінокислотній послідовності сульфамідази, як це визначено в SEQ ID NO:1, були:

N(21), що містить фрагмент (залишок 4-35 послідовності SEQ ID NO:1, 3269.63 Da)

N(122), що містить фрагмент (залишок 105-130 послідовності SEQ ID NO:1, 2910.38 Da)

N(131), що містить фрагмент (залишок 131-134 послідовності SEQ ID NO:1, 502.29 Da)

N(244), що містить фрагмент (залишок 239-262 послідовності SEQ ID NO:1, 2504.25 Da)

N(393), що містить фрагмент (залишок 374-394 послідовності SEQ ID NO:1), 2542.22 Da.

Аспарагін кожного потенційного сайту глікозилювання виділено жирним шрифтом, а також вказана молекулярна маса кожного пептидного фрагмента.

Можливі варіанти глікозилювання п'яти фрагментів триптичного пептиду досліджували за допомогою аналізу глікопептидів. Це було виконано за допомогою рідинної хроматографії з наступною мас-спектрометрією на системі вискоєфективної рідинної хроматографії Agilent 1200, з'єднаної з квадрупольним часопротітним мас-спектрометром Agilent 6510 (Q-TOF-MS). Обидві системи контролювалися за допомогою робочої станції MassHunter. Відокремлення рідинної хроматографії виконувалося з використанням колонки Waters XSELECT CSH 130 C18 (150  $\times$  2,1 мм), де температура колонки була встановлена на 40 °C. Мобільна фаза А складалася з 5 % ацетонітрилу, 0,1 % пропіонової кислоти і 0,02 % TFA (трифтороцтової кислоти), а рухома фаза В складалася з 95 % ацетонітрилу, 0,1 % пропіонової кислоти і 0,02 % TFA (трифтороцтової кислоти). Градієнт від 0 % до 10 % В протягом 10 хв., потім від 10 до 70 % В протягом 25 хв. використовували при швидкості потоку 0,2 мл/хв. Обсяг введеної пробі становив 10 мкл. Квадрупольний часопротітний мас-спектрометр працював у режимі іонізації позитивним електророзпилюванням. В процесі збору даних, напруга фрагментатора, напруга скімера і коефіцієнт утримання восьмиполіусника були встановлені на 90, 65 і 650 V, відповідно. Мас-діапазон становив від 300 до 2800 питомих електричних зарядів.

#### Результат

Перехідна експресія в клітинах нирки ембріона людини HEK293 призвела до низьких рівнів секретованої сульфамідази (менше 0,3 мг/л середовища, SEQ ID NO:3). Результатом стабільної епісомальної системи експресії QMCF (Icosagen AS) стало одержання сульфамідази (SEQ ID NO:2) в титрах більше 10 мг/л в клітинах CHO (клітинах яєчника китайського хом'ячка)). Стабільна клітинна лінія, утворена з системи експресії CHO, призвела до одержання титрів сульфамідази (SEQ ID NO:1), що перевищують 40 мг/л.

Сульфамідазу очистили до стану помітної гомогенності з молекулярною масою в діапазоні 61-63 кДа. На підставі теоретичного пептидного ланцюга масою 55 кДа, це вказує на присутність гліканів з загальною молекулярною масою 6-8 кДа. Чистоту та ідентичність партій сульфамідази аналізували за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу та часопротітної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці (результати не показані).

Аналіз глікозилювання пептидів, розщеплених трипсином, проводили за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (PX-MS). Був виконаний ручний пошук 30 різних видів глікозилювання на кожному глікопептиді. Відносне кількісне визначення проводили шляхом вимірювання площі піків від реконструйованих іонних хроматограм (без корекції ефективності

іонізації). Чотири з п'яти передбачуваних сайтів N-глікозилування (N(21), N(131), N(244) і N(393)) послідовно піддавалися глікозилуванню у всіх партіях сульфамідази. N(21) і N(393) були переважно зайняті складними гліканами, з низьким ступенем повного сіалірування. N(131) був повністю зайнятий гліканами олігоманозного типу. Ступінь гліканового фосфорилування становила приблизно 50 % для всіх партій. Сайт N(131) був стійкий до дефосфорилування за допомогою лужної фосфатази. Четвертий сайт, N(244), відрізнявся за складом сульфамідази, одержаної з клітини CHO (SEQ ID NO:2) та клітини HEK293 (SEQ ID NO:3), тим, що мав олігоманозний тип в партіях CHO, та мішанину олігоманозного/комплексного типу в партіях HEK293. Був виявлений триптичний пептид, що містить N(122), без жодних доданих гліканів.

#### Приклад 2:

Хімічна модифікація сульфамідази відповідно до відомого способу  
Матеріал і способи

Хімічна модифікація відповідно до відомого способу (як описано в WO 2008/109677): Для модифікації гліканових фрагментів сульфамідази, сульфамідазу (SEQ ID NO:2), одержану згідно з описом в Прикладі 1 в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QCMF) (Icosagen AS), спочатку інкубували за допомогою 20 мМ метаперіодату натрію при температурі 0 °C протягом 6,5 годин в 20 мМ фосфату натрію, 100 мМ NaCl (pH 6,0). Гліканове окислення гасили шляхом додавання етиленгліколю до кінцевої концентрації 192 мМ. Гасіння протікало протягом 15 хв. при 0 °C перед проведенням діалізу на фоні 20 мМ фосфату натрію, 100 мМ NaCl (pH 6,0) протягом ночі при температурі 4 °C. Після діалізу, відновлення проводили шляхом додавання реакційної суміші боргідриду натрію до кінцевої концентрації 100 мМ. Реакція відновлення протікала протягом ночі. Нарешті, препарат ферменту піддавали діалізу на фоні 20 мМ фосфату натрію, 100 мМ NaCl (pH 7,5). Всі інкубації проводили в темряві.

#### Результати

Модифікована сульфамідаза була одержана у трьох екземплярах відповідно до послідовності стадій, зображених на Фігурі 1A.

#### Приклад 3:

Аналізи сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу

Матеріал і способи

Сульфамідаза, модифікована згідно з Прикладом 2, що відповідає відомому способу, була піддана наступним аналізам.

Аналіз методом ДСН-ПААГ-електрофорезу: 5 мкг модифікованої сульфамідази були завантажені в кожну лунку на гелі NuPAGE 4-12 % Bis-Tris. Був використаний маркер Seebblue 2 plus, і гель був зафарбований Instant Blue (C.B.S Scientific).

Аналіз за допомогою гелю-проникної хроматографії (ГПХ): Модифікований фермент аналізували за допомогою аналітичної гелю-проникної хроматографії, що виконувалася на системі ÄKTAmicro (GE Healthcare). Використовували колонку Superdex 200 PC 3.2/30 зі швидкістю потоку 40 мкл/хв. рецептурного буфера. Обсяг проби склав 10 мкл і містив 10 мкг ферменту.

Аналіз шляхом динамічного розсіювання світла (ДРС): Модифіковану сульфамідазу дегазували шляхом центрифугування при 12000 обертів за хвилину протягом 3 хв. при кімнатній температурі (КТ). Експерименти ДРС проводилися на інструменті DynaPro Titan (Wyatt Technology Corp) з використанням 25 % потужності лазера в 3 паралельних аналізах по 75 мкл кожний.

Аналіз шляхом ферментативного гідролізу в гелі та часопролітної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці: Аналіз шляхом ДСН-ПААГ-електрофорезу виявив декілька додаткових смуг, які були відрізані, знебарвлені та оброблені шляхом ферментативного гідролізу в гелі за допомогою трипсину. Процедура полягала в наступному:

i. Знебарвлення Кумасі: відрізані гелеві смуги помістили в пробірки Еппендорфа. Пробірки збовтували двічі в 100 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$  в 50 % ацетонітрилу при температурі 30 °C протягом 1 години. Надосадові рідини (супернатанти) видаляли.

ii. Відновлення та алкілування: гелеві зразки обезводнили в ацетонітрилі, висушили в Speed Vac, а потім покрили 10 мМ DTT (дітіотреїтолу) в 100 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$ . Відновлення проводили протягом 1 години при температурі 57 °C. Надосадову рідину видалили і замінили її 55 мМ йодацетаміду в 100 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$ . Алкілування виконували протягом 45 хвилин при кімнатній температурі, в темряві та при слабкому збовтуванні. Надосадову рідину знову видалили. Гель промивали 100 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$  в 50 % ацетонітрилу протягом 20-30 хв. при 30 °C, після чого надосадову рідину видалили. Гелеві зразки були висушені повністю в Speed Vac.

iii. Ферментативний гідроліз в гелі за допомогою трипсину: 2-5 мкл 50 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$  додали до висушених гелевих зразків, після чого додали 5 мМ розчину трипсину (0,1 мкг/мкл в 1 %

оцтової кислоти). Ще 50 мМ  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$  додали, щоб викликати набухання гелю. Гідроліз проводили протягом ночі при 37 °C (зі збовтуванням). Надосадову рідину переносили в нову пробірку і екстрагували додаванням 60 % ацетонітрилу, 0,1 % TFA (трифтороцтової кислоти) (3×20 хв.) при кімнатній температурі. Одержані надосадові рідини випарювали в Speed Vac майже до сухості. Концентрований розчин змішували в пропорції 1:1 з розчином альфа-ціано-4-гідроксикоричної кислоти (10 мг/мл), і 0,6 мкл наносили на пластину для лазерної іонізації і десорбції з рідкої матриці.

Молекулярні маси фрагментів триптичних пептидів визначали з використанням часопролітного мас-спектрометра з лазерною іонізацією/десорбцією з рідкої матриці (MALDI-TOF/TOF MS). Аналізи проводили в режимі рефлектрону для реєстрації позитивних іонів з лазерною енергією в 3550 і 400 імпульсів.

Збереження активного сайту: Будь-який ефект хімічної модифікації в активному сайті сульфамідази досліджували з використанням аналізів шляхом PX-МС та PX-МС/МС. Зразки були приготовлені відповідно до методу PX-МС, описаного у частині Аналіз глікозилування в Прикладі 1. Всі одержані триптичні пептиди, що містять варіанти цистеїну 50 (цистеїн 50 (алкілований)), окиснений цистеїн 50, FGly50 і Ser50), були відображені напівкількісно шляхом обчислення площ піків з реконструйованих іонних хроматограм. Ідентичність пептидів визначалася шляхом послідовного виконання MCMC. Параметри MCMC були наступними: енергії зіткнень були встановлені на 10, 15 і 20 В, діапазон сканування 100-1800 питомих електричних зарядів, а швидкість сканування 1 сканування в секунду.

#### Результати

Аналіз методом ДСН-ПААГ-електрофорезу: Як видно з аналізу методом ДСН-ПААГ-електрофорезу, в результаті хімічної модифікації утворилися декілька пептидів, чиї розміри відрізняються від розмірів сульфамідази повної довжини (Фігура 2А).

Аналіз за допомогою гелі-проникної хроматографії та динамічного розсіювання світла: Було встановлено, що процедура хімічної модифікації сприяє агрегації сульфамідази, як показано в якості піку домішки, розташованого перед головним піком, на хроматограмі на Фігурі 3А. Було виявлено, що максимальна висота піку домішки, розташованого перед головним піком, на хроматограмі становить приблизно 3 % від висоти основного піку.

Крім того, аналіз шляхом динамічного розсіювання світла виявив, що такий же матеріал містив 15-20 % білка від загального вмісту білка в формах з високою молекулярною масою (тобто вище  $10^{10}$  кДа) (Фігура 4А).

Аналіз смуг з ДСН-ПААГ-електрофорезу: Завдяки аналізу за допомогою часопролітної мас-спектрометрії з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці, чотири гелеві смуги № 1-4, які спостерігаються на ДСН-ПААГ-електрофорезі (Фігура 2А), можна ідентифікувати як фрагменти сульфамідази, генеровані розривами ланцюгів в процесі хімічної модифікації.

Гелеві смуги № 1 і № 2 на Фігурі 2А були визначені як два усічення С-термінальної частини з молекулярними масами 6 кДа і 30 кДа, гелева смуга № 3 - як одне усічення N-термінальної частини з молекулярною масою 41 кДа, а гелева смуга № 4 - як одна димерна форма сульфамідази (смуга з молекулярною масою 111 кДа), що утворилася в результаті хімічної модифікації (спектри лазерної іонізації і десорбції з рідкої матриці не показані).

Таким чином, було встановлено, що хімічна модифікація сульфамідази відповідно до відомого способу не тільки змінює глікани, але і створює розриви ланцюгів в певних положеннях поліпептидного ланцюга сульфамідази.

Також було встановлено, що хімічна модифікація відповідно до відомого способу вводить окислення на декількох залишках метіоніну на сульфамідазі, зокрема, на метіоніні 184 і метіоніні 443, які були майже повністю окиснені. Метіонін 226 (виявлений в триптичному пептиді T23, що відповідає амінокислотним залишкам 226-238) був окислений в набагато меншому ступені, але виявилось, що це окислення призводить до появи більш нестабільного білка, ніж сульфамідаза як така, породжуючи усічення N-термінальної частини з молекулярною масою 41 кДа (гелева смуга № 3 на Фігурі 2А). Таким чином, окислення метіоніну 226 і розриви ланцюгів здавалися скорельованими, як це спостерігалось при аналізі методом мас-спектрометрії. Крім того, димерна смуга (№ 4 на Фігурі 2А) також переважно містила окислений метіонін 226 (Фігура 2А).

Отже, відома процедура модифікації гліканів каталізує окислення амінокислотних залишків, важливих для структурної цілісності ферменту.

Збереження активного сайту: Крім того, завдяки використанню PX-MCMC, виявилось, що стадія відновлення відновлює залишок FGly на позиції 50 активного сайту послідовності SEQ ID NO: 1 до Ser. Ser у цій позиції не відповідає ефективному каталізу (Recksiek et al., J Biol Chem 273(11):6096-103 (1998)). Відносна кількість Ser, одержаного з FGly, була розрахована на основі вимірювань площі піків двозаряджених іонів в мас-спектрі, що відповідають двом фрагментам

триптичних пептидів, що містять FGly50 і Ser50. Площі піків оснований на реакції MC без поправки на ефективність іонізації. У нижченаведеній Таблиці 1 показано, що перетворення FGly в Ser становить приблизно 56 % після модифікації відповідно до відомого способу (див. також Приклад 5, Таблиця 2).

5

Таблиця 1

Перетворення FGly в Ser в активному сайті

Хімічна модифікація сульфамідази	Утворення Ser (%)	Співвідношення FGly/Ser
Немає	0	
Відомий спосіб	56,0±0,3 (n=3)	0,8

Таким чином, відома процедура хімічної модифікації, на додаток до модифікацій, зазначених вище, викликає відновлення амінокислотних залишків, критичних для каталітичної активності ферменту.

10

Приклад 4:

Нові способи хімічної модифікації сульфамідази

Матеріал і способи

15

Новий спосіб 1: Сульфамідазу, одержану в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QCMF) (Icosagen AS) згідно з Прикладом 1, окисляли шляхом інкубації за допомогою 20 mM метаперіодату натрію при температурі 0 °C в темряві протягом 120 хв. в фосфатних буферах з рівнем pH=6,0. Гліканове окислення гасили шляхом додавання етиленгліколю до кінцевої концентрації 192 mM. Гасіння протікало протягом 15 хв. при 6 °C перед тим, як боргідрид натрію додали до реакційної суміші до кінцевої концентрації 50 mM. Після інкубації при 0 °C протягом 120 хв. в темряві, одержаний препарат сульфамідази піддавали ультрафільтрації на фоні 20 mM фосфату натрію, 100 mM NaCl, pH 6,0. Новий спосіб 1 хімічної модифікації зображений на Фігурі 1B.

20

Новий спосіб 2: Виконаний, як Новий спосіб 1, за винятком того, що концентрація боргідрида натрію на стадії відновлення була 10 mM. Новий спосіб 2 хімічної модифікації зображений на Фігурі 1C.

25

Новий спосіб 3: Сульфамідазу, одержану в лінії стабільних клітин відповідно до Прикладу 1, окисляли шляхом інкубації за допомогою 10 mM метаперіодату натрію при температурі 0 °C в темряві протягом 180 хв. в ацетатному буфері з початковим рівнем pH від 4,5 до 5,7. Гліканове окислення гасили шляхом додавання етиленгліколю до кінцевої концентрації 192 mM. Гасіння протікало протягом 15 хв. при 6 °C перед тим, як боргідрид натрію додали до реакційної суміші до кінцевої концентрації 25 mM. Після інкубації при 0 °C протягом 60 хв. в темряві, одержаний препарат сульфамідази піддавали ультрафільтрації на фоні 10 mM фосфату натрію, 100 mM NaCl, pH 7,4. Новий спосіб 3 хімічної модифікації зображений на Фігурі 1D.

30

Новий спосіб 4: Сульфамідазу, одержану в лінії стабільних клітин відповідно до Прикладу 1, окисляли шляхом інкубації за допомогою 10 mM метаперіодату натрію при температурі 8 °C в темряві протягом 60 хв. в ацетатному буфері з початковим рівнем pH=4,5. Гліканове окислення гасили шляхом додавання етиленгліколю до кінцевої концентрації 192 mM. Гасіння протікало протягом 15 хв. при 6 °C перед тим, як боргідрид натрію додали до реакційної суміші до кінцевої концентрації 25 mM. Після інкубації при 0 °C протягом 60 хв. в темряві, одержаний препарат сульфамідази піддавали ультрафільтрації на фоні 10 mM фосфату натрію, 100 mM NaCl, pH 7,4.

35

Дослідження другої стадії гасіння: Ефект від гасіння другої стадії дослідили шляхом додавання 0,1 M ацетона після стадії інкубації боргідриду натрію в новому способі 1. Матеріал одержували паралельно відповідно до нового способу 1 аж до і включаючи додавання і гасіння боргідриду натрію, а після цього реакцію в одному зразку гасили додаванням ацетону. Потім обидва зразки були оброблені відповідно до стадії ультрафільтрації в новому способі 1.

40

Новий спосіб 5: Сульфамідаза, одержана в лінії стабільних клітин відповідно до Прикладу 1, була окислена шляхом інкубації за допомогою 10 mM метаперіодату натрію при температурі 8 °C в темряві протягом 60 хв. в ацетатному буфері з початковим рівнем pH 4,5. Гліканове окислення гасили шляхом додавання етиленгліколю до кінцевої концентрації 192 mM. Гасіння протікало протягом 15 хв. при 6 °C перед тим, як боргідрид натрію додали до реакційної суміші до кінцевої концентрації 25 mM. Після інкубації при 0 °C протягом 45 хв. в темряві і гасіння реакції за допомогою 0,1 M ацетону, одержаний препарат сульфамідази піддавали ультрафільтрації на фоні 10 mM фосфату натрію, 100 mM NaCl, pH 7,4.

45

Результати

50

Як вже раніше пояснювалося в даному документі, метаперіодат натрію є окислювачем, який перетворює *cis*-гліколеві групи вуглеводів на альдегідні групи, де боргідрид є відновником, що відновлює альдегіди до більш інертних спиртів. Таким чином, вуглеводна структура підлягає необоротному руйнуванню.

З метою забезпечення покращеного способу хімічної модифікації гліканів, зокрема, процедури, яка забезпечує модифіковану сульфамідазу з покращеними властивостями, були оцінені різні умови проведення реакції. Можна зробити висновок, що як окислення за допомогою метаперіодату натрію, так і відновлення боргідридом натрію впровадили поліпептидні модифікації і агрегацію; властивості, що мають негативний вплив на каталітичну активність та імуногенну схильність.

Були виявлені умови для вдосконаленої процедури хімічної модифікації. Несподівано, ці умови сприяли тому, що стадія відновлення могла бути виконана відразу ж після стадії гасіння етиленгліколя, оминаючи зміну буфера і тривале піддання сульфамідази впливові проміжних продуктів реактивних альдегідів. Нові процедури хімічної модифікації зображені на Фігурі 1B, Фігурі 1C і Фігурі 1D.

Приклад 5:

Аналізи сульфамідази, модифікованої відповідно до нових способів

Матеріал і способи

Сульфамідаза, модифікована відповідно до нових способів за Прикладами 4, була піддана наступним аналізам.

Аналіз методом ДСН-ПААГ-електрофорезу: 5 мкг сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу (Приклад 2), а також до нового способу 1 і 2 (Приклад 4), були завантажені в окремі індивідуальні лунки згідно з описом в Прикладі 3. Так само, 5 мкг сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 1 (Приклад 4), а також до нового способу 3, 4 і 5 були завантажені в окремі індивідуальні лунки згідно з описом в Прикладі 3.

Аналіз за допомогою гель-проникної хроматографії (ГПХ): Сульфамідаза, модифікована відповідно до нового способу 1-4, була аналізована за допомогою гель-проникної хроматографії згідно з Прикладом 3.

Аналіз шляхом динамічного розсіювання світла (ДРС): Сульфамідаза, модифікована відповідно до нового способу 1, була аналізована за допомогою ДРС згідно з Прикладом 3.

Збереження активного сайту: Будь-який ефект хімічної модифікації в активному сайті сульфамідази, одержаної відповідно до нового способу 1-5, а також другу досліджувану стадію гасіння, досліджували згідно з описом в Прикладі 3.

Результати

Аналіз методом ДСН-ПААГ-електрофорезу: В результаті хімічної модифікації способом 1 (Фігура 2B) утворилися декілька пептидів, чий розміри відрізняються від розмірів сульфамідази повної довжини. Проте, в порівнянні до сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого способу, новий спосіб 1 призвів до зменшення фрагментації. Фрагмент № 1 (Фігура 2A), визначений як С-термінальні амінокислоти 434-482, не викривався в зразках сульфамідази, одержаної новими способами 1, 3 і 4, а кількість інших фрагментів була значно знижена. Ця тенденція ще більш виражена в матеріалі, одержаному новим способом 2. Однак, новим способом 2 були одержані форми з більш високою молекулярною масою, присутні на гелі, що свідчить про те, що кількість відновника не була достатньою, щоб відновити всі реакційні альдегіди, утворені на стадії окислення (дані не показані). Новими способами 3, 4 і 5 був одержаний матеріал модифікованої сульфамідази, аналогічний матеріалові, що був одержаний новим способом 1 (дані не показані).

Таким чином, розриви ланцюгів в поліпептиді сульфамідази, одержаному відповідно до нових способів, обмежені в порівнянні з виникненням розривів ланцюгів в сульфамідазі, що була одержана відповідно до Прикладу 2.

Аналіз за допомогою гель-проникної хроматографії (ГПХ): Було виявлено, що сульфамідаза, модифікована відповідно до нового способу 1, містить менше скупчень у порівнянні з сульфамідазою, модифікованою відомим способом. Це показано на хроматограмах на Фігурі 3, де форма з високою молекулярною масою присутня на хроматограмі в якості піку домішки, розташованого перед головним піком. Максимальна висота піку домішки, розташованого перед головним піком, на Фігурі 3B становить 0,5 % по відношенню до висоти головного піку, таким чином, демонструючи зниження в порівнянні з висотою піка (3 %) на Фігурі 3A. Це також відноситься до сульфамідази, модифікованої відповідно до нового способу 3, 4 і 5 (дані не показані).

Аналіз шляхом динамічного розсіювання світла (ДРС): Аналіз шляхом ДРС (Фіг. 4B) підтвердив результати, одержані в процесі аналізу за допомогою ГПХ: сульфамідаза, одержана

відповідно до нового способу, містила 5 % білка в формах з високою молекулярною масою (вище  $10^{10}$  кДа). Таким чином, можна зробити висновок, що формування агрегованих форм сульфамідази обмежується новими способами в порівнянні з відомим способом (див. Приклад 3).

- 5 Збереження активного сайту: Відновлення FGly до Ser в позиції 50 в активному сайті сульфамідази було визначене шляхом PX-MC/MC, і були точно визначені триптичні пептиди, що містять FGly і Ser. Відносну кількість пептидних фрагментів була аналізована за допомогою PX-MC шляхом вимірювання площі піків з реконструйованих іонних хроматограм двозаряджених іонів (без поправки на ефективність іонізації). Були утворені та проаналізовані зразки, одержані
- 10 відповідно до способів, що були використані в Прикладі 4 для хімічної модифікації (Таблиця 2).

Таблиця 2

## Перетворення FGly в Ser в активному сайті

Хімічна модифікація сульфамідази	Утворення Ser (%)	Співвідношення FGly/Ser
Немає	0	
Новий спосіб 1	45,4±0,9 (n=3)	1,2
Новий спосіб 2	11,5±1,3 (n=3)	7,7
Новий спосіб 3	44,1±2,0 (n=2)	1,2
Новий спосіб 4	36,1 (n=1)	1,6
Новий спосіб 5	41,7±1,1 (n=2)	1,4

- Втрата активного сайту FGly істотно обмежена новими способами. Нові способи модифікації гліканів на сульфамідазі значно зменшили кількість утворення Ser, з 56 % з використанням відомого способу (див. Таблицю 1, Приклад 3) до 45, 44, 36 і 42 % (новий спосіб 1, 3, 4 і 5, відповідно, Таблиця 2). Утворення Ser новим способом 2 становило близько 11 %, що свідчить про те, що перетворення FGly в Ser сильно залежало від концентрації боргідриду натрію.
- 15

- Друга стадія гасіння реакції забезпечила утворення модифікованої сульфамідази, порівняної з сульфамідазою, що була одержана без гасіння реакції (модифікована сульфамідаза, одержана новим способом 1, має 45 % утворення Ser у порівнянні з 43 % утворення Ser після гасіння другої реакції за допомогою ацетону). Це було додатково підтверджено новим способом 5, який також включає стадію гасіння.
- 20

Приклад 6:

Рецепторно-опосередкований ендоцитоз in vitro

- 25 Матеріал і способи

- Сульфамідаза була одержана згідно опису в Прикладі 1, 2 і 4, утворена в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) і модифікована відповідно до відомого способу і нових способів 1 і 2. Ендоцитоз оцінювали в фібробластах ембріону миші MEF-1, що експресують рецептори M6P. Клітини MEF-1 інкубували протягом 24 годин в мінімальному есенціальному середовищі Ігла, модифікованому способом Дульбеко (DMEM), доповненому 75 мМ сульфамідази. Клітини промивали двічі в мінімальному есенціальному середовищі Ігла, модифікованому способом Дульбеко, та один раз в 0,9 % NaCl до лізису клітин з використанням 1 % Triton X100. Були визначені активність сульфамідази лізату і загальний вміст білка, а також була розрахована питома активність лізату. Активність контролювали за допомогою інтенсивності флуоресценції при 460 нм з використанням 0,25 мМ 4-метилумбелліферил-альфа-D-N-сульфоглюкозамініду в якості субстрату в 14,5 мМ диетилбарбітурової кислоти, 14,5 мМ ацетата натрію, 0,34 % (у відношенні ваги до об'єму) NaCl і 0,1 % BSA (біс(триметилсиліл)ацетаміду). Загальну концентрацію білка визначали за допомогою набору реагентів для визначення білка за допомогою біцинхонінової кислоти (Pierce) з BSA в якості стандарту. Дані представлені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення (n = 4).
- 30
- 35
- 40

Результати

- Активність сульфамідази може бути виявлена в клітинному гомогенаті для всіх препаратів, які оцінювали в аналізі ендоцитозу. Модифікована сульфамідаза, що була одержана відомим способом, а також новими способами 1 і 2, продемонструвала специфічну активність в клітинному гомогенаті нижче 10 % у порівнянні до гомогенату, що був одержаний з немодифікованої рекомбінантної сульфамідази (Фігура 5). Активність, що зберігалася в клітинах, спочатку завантажених і потім вирощених при відсутності сульфамідази протягом 2
- 45

днів, була порівняною для всіх препаратів, показуючи, що хімічна модифікація не має негативного впливу на лізосомальну стабільність.

Таким чином, можна зробити висновок, що хімічна модифікація робить сульфамідазу менш схильною до клітинного поглинання, яке є наслідком видалення епітопів для таких рецепторів розпізнавання гліканів, як M6PR. На макроскопічному рівні, ця втрата молекулярних взаємодій призводить до зниженого кліренсу з плазми при введенні внутрішньовенно. Зменшений кліренс білка може дозволити скоротити частоту введення дози пацієнтам.

Приклад 7:

Плазмовий кліренс *in vivo* модифікованої сульфамідази, що була одержана новим способом

Матеріал і способи

Плазмовий кліренс (ПК) немодифікованої і модифікованої рекомбінантної сульфамідази, одержаної згідно опису в Прикладі 1, в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS), і модифікованої відповідно до нового способу 1 з Прикладу 4, досліджували у мишей (C57BL/6J). Миші одержували внутрішньовенне введення одноразової дози в хвостову вену 10 мг/кг сульфамідази і 10 мг/кг модифікованої сульфамідази. Сульфамідаза і модифікована сульфамідаза були утворені в дозі 2 мг/мл і введені в дозі 5 мл/кг. Зразки крові бралися з підшкірної вени або порожнистої вени в різні контрольні моменти часу аж до 24 годин після введення дози (3 миші на контрольний момент часу). Кров збирали у вакутейнери, які зберігали на льоду, а плазму одержували шляхом центрифугування. Рівні сульфамідази і модифікованої сульфамідази в плазмі аналізували за допомогою ЕХЛ. Плазмовий кліренс був розрахований з використанням програмного забезпечення WinNonlin версії 6.3 (Non-compartmental analysis, Phoenix, Pharsight Corp., USA).

Кількісне вираження сульфамідази і модифікованої сульфамідази методом імунологічного аналізу шляхом електрохемилюмінесценції (ЕХЛ): Сульфамідазу і модифіковану сульфамідазу в фармакокінетичних пробах плазми визначали методом імунологічного аналізу шляхом ЕХЛ з використанням платформи Meso Scale Discovery (MSD). Планшет MSD, покритий стрептавідином, блокували за допомогою 5 % Блокатора-А в фосфатно-сольовому буфері. Планшет промивали, і різні розведення стандартних і фармакокінетичних проб розподілялися в планшеті. Додали суміш біотинілірованого протисульфамідазного мишачого моноклонального антитіла і сульфо-Ru-мічених кролячих протисульфамідазних антитіл, і інкубували планшет при кімнатній температурі. Комплекси сульфамідази і мічених антитіл зв'язуються з планшетом, покритим стрептавідином, через біотиніліроване моноклональне антитіло. Після промивки, кількість зв'язаних комплексів визначали шляхом додавання буфера зчитування в лунки і планшет зчитували на приладі MSD SI2400. Записані імпульси ЕХЛ були пропорційними кількості сульфамідази в пробі і оцінювалися на підставі відповідного стандарту сульфамідази.

Результати

Плазмовий кліренс у мишей з модифікованою сульфамідазою був приблизно в 10 разів нижчим в порівнянні з немодифікованою сульфамідазою, див. Таблицю 3 нижче. Це, ймовірно, принаймні частково завдяки пригніченню рецепторно-опосередкованого поглинання в периферичній тканині після хімічної модифікації сульфамідази (як показано в дослідженнях клітинного поглинання у Прикладі 6).

Дані про кліренс у мишей, одержані для модифікованої сульфамідази, одержаної в лінії стабільних клітин відповідно до Прикладу 1 і модифікованої відповідно до нового способу 3 з Прикладу 4, відповідали даним, представленим в Таблиці 3 для модифікованої сульфамідази, отриманої в системі QMCF і модифікованої новим способом 1. Знижений кліренс білка може дозволити знизити частоту введення дози для пацієнтів.

Таблиця 3

Плазмовий кліренс сульфамідази і модифікованої сульфамідази

Об'єкт дослідження	Доза (мг/кг)	Плазмовий кліренс (л/(год.·кг))
Сульфамідаза (SEQ ID NO: 2)	10	0,17
Модифікована сульфамідаза (новий спосіб 1, SEQ ID NO:2)	10	0,014

Приклад 8:

Вплив *in vivo* модифікованої сульфамідази на накопичення гепарансульфату в головному мозку

## Матеріали і способи

Був досліджений вплив внутрішньовенно введеної модифікованої сульфамідази, одержаної згідно з описом в Прикладі 1, в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS), і модифікованої відповідно до нового способу 1 з Прикладу 4 на накопичення гепарансульфату в головному мозку *in vivo*.

Приготування дослідного зразка: Модифікована сульфамідаза була утворена в дозі 6 мг/мл, відфільтрована в стерильних умовах і заморожена при  $-70^{\circ}\text{C}$  до використання. Заморожену модифіковану сульфамідазу і відповідний провідник розморожували в день ін'єкції при кімнатній температурі протягом не менше однієї години до двох годин перед використанням. Хлорфенірамін розчинили в ізотонічному сольовому розчині до концентрації 0,5 мг/мл і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Тварини: Були використані самці мишей, що мають спонтанну гомозиготну мутацію в гені *mps3a*, B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ (МПС IIIA) (Jackson Laboratories, ME, США). Тварин утримували поодиночі в клітках при температурі  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  і вологості 40-60 %, при цьому тварини мали вільний доступ до води і стандартної лабораторної їжі. 12/12-годинний цикл світло/темрява був встановлений на включення світла о 7 годині вечора. Тварин акліматизували протягом принаймні двох тижнів перед початком дослідження. Суродженці дикого типу з того ж самого виводка були також включені в якості контрольної групи. У дослідженні А вік мишей становив 23-24 тижні, в той час як в дослідженні В вік мишей дорівнював 9-10 тижнів.

Експериментальна методика дослідження А: Модифіковану сульфамідазу в дозі 30 мг/кг ( $n=8$ ) і провідник ( $n=7$ ) вводили внутрішньовенно мишам, що страждають від МПС IIIA, через день протягом двадцяти п'яти днів (13 ін'єкцій). Хлорфенірамін вводили в дозі 2,5 мг/кг підшкірно за 30-45 хв. до введення модифікованої сульфамідази або провідника. Введення доз починали приблизно в 07.00 ранку. Дослідний зразок і провідник вводили в дозі 5 мл/кг. Кінцевий об'єм введення коректували для фактичної ваги тіла для кожного випадку введення дози. Ця схема була повторена для провідника. Дослідження було завершено через 2 години після останньої ін'єкції. Контрольна група мишей дикого типу відповідного віку ( $n=5$ ) була включена в поєднанні з групами, яким вводили дослідний зразок. Мишей анестезували ізофлураном. Кров відбирали шляхом кровопускання з ретро-орбітального сплетіння. Виконали перфузію з наступним промиванням 20 мл соляного розчину через лівий шлуночок серця. Тканини препарували (головний мозок, печінка, селезінка, легені і серце), зважували і швидко заморожували в рідкому азоті. Тканини і кров були підготовлені для вимірювання рівнів гексозаміна N-сульфату [ $\alpha$ -1, 4] уронової кислоти (HNS-UA) за допомогою РХ-МС/МС. HNS-UA є дисахаридним маркером накопичення гепарансульфату, і, таким чином, зниження рівнів HNS-UA відображає зниження гепарансульфату. Дані HNS-UA були розраховані в відносних одиницях у порівнянні до внутрішнього стандарту, виражені на мг тканини і нормалізовані до середнього значення контрольної групи. Дані були проаналізовані шляхом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), а загальна вірогідність була продемонстрована також шляхом багаторазового ретроспективного порівняння Бонферроні критеріїв вірогідності між групами (\* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ ).

Експериментальна методика дослідження В: Модифіковану сульфамідазу в дозі 30 мг/кг ( $n=6$ ), 10 мг/кг ( $n=6$ ) і провідник ( $n=6$ ) вводили внутрішньовенно мишам, що страждають від МПС IIIA, один раз на тиждень протягом 10 тижнів (10 ін'єкцій). Хлорфенірамін вводили в дозі 2,5 мг/кг підшкірно за 30-45 хв. до введення модифікованої сульфамідази або провідника. Кінцевий об'єм введення коректували для фактичної ваги тіла для кожного випадку введення дози. Ця схема була повторена для провідника. Дослідження було завершено через 24 години після останньої ін'єкції. Контрольна група мишей дикого типу відповідного віку ( $n=6$ ) була включена в поєднанні з групами, яким вводили дослідний зразок. Мишей анестезували ізофлураном. Кров відбирали шляхом кровопускання з ретро-орбітального сплетіння. Виконали перфузію з наступним промиванням 20 мл соляного розчину через лівий шлуночок серця. Тканини препарували (головний мозок, печінка, селезінка), зважували і швидко заморожували в рідкому азоті. Тканини і кров були підготовлені для вимірювання рівнів HNS-UA за допомогою РХ-МС/МС. Дані HNS-UA були розраховані в відносних одиницях у порівнянні до внутрішнього стандарту, виражені на мг тканини і нормалізовані до середнього значення контрольної групи. Дані були проаналізовані шляхом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), а загальна вірогідність була продемонстрована також шляхом багаторазового ретроспективного порівняння Бонферроні критеріїв вірогідності між групами (\* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ ).

Аналіз методом РХ-МС/МС в зразках тканин: Аналіз методом рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (РХ-МС/МС) гексозаміна N-сульфату [ $\alpha$ -1, 4] уронової кислоти (HNS-UA) в зразках тканин виконували частково відповідно до способів, описаних авторами



Fuller et al. (Pediatr Res 56: 733-738 (2004)) і Ramsay et al. (Mol Genet Metab 78:193-204 (2003)). Тканини (90-180 мг) гомогенізували в субстратному буфері (29 мМ діетилбарбітурової кислоти, 29 мМ ацетату натрію, 0,68 % (у відношенні ваги до об'єму) NaCl, 100 мл води, pH 6,5, з використанням пристрою Lysing Matrix D device (MP Biomedicals, LLC, штат Огайо, США).  
 5 Гомогенізацію проводили протягом 25 секунд в гомогенізаторі Savant FastPrep FP120/Bio101 (LabWrench, ON, Канада), а гомогенат потім центрифугували в центрифугі Еппендорф 5417R при 10000 rcf. Надосадову рідину випарювали майже насухо. Додали 150 мкл розчину, використовуваного для отримання похідних (250 мМ 3-метил-1-феніл-2-піразолін-5-ону (ПМП), 400 мМ NH<sub>3</sub>, pH 9,1) і 5 мкл маточного розчину внутрішньостандартного хондроїтину дисахариду Δdi-4S натрію (ΔUA-GalNAc4S, 0,1 мг/мл). Одержання похідних виконували при 70 °C протягом 90 хв. зі збовтуванням, а потім розчини підкислили за допомогою 200 мкл 800 мМ мурашиної кислоти. До зразків додали деіонізовану воду до кінцевого об'єму 500 мкл, і виконали екстракцію хлороформом (3×500 мкл) для видалення надлишку ПМП. Центрифугування проводили при 13000 × g протягом 5 хв., і перенесли верхню фазу в нову пробірку. Для того, щоб видалити будь-який надлишок мурашиної кислоти і NH<sub>4</sub>COOH, водну фазу упарювали насухо в speed vac (центробіжний випарник компанії Savant Instruments Inc., Farmingdale, Нью-Йорк). Зразки відновили в цілому до 100 мкл 5 % ацетонітрилу/0,1 % оцтової кислоти/0,02 % TFA (трифтороцтової кислоти).

Аналіз методом РХ-МС/МС виконували за допомогою ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ) на хроматографі Waters, з'єднаному з потрійним квадрупольним мас-спектрометром Sciex API 4000. Керування приладом, збір даних і оцінювання виконувалися за допомогою програмного забезпечення Analyst.

Відокремлення РХ виконувалося з використанням колонки Acquity C18 CSH (50×2,1 мм, 1,7 мкм). Рухома фаза А складалася з 5 % ацетонітрилу/0,5 % мурашиної кислоти, а рухома фаза В складалася з 95 % ацетонітрилу/0,5% мурашиної кислоти. Градієнт від 1 до 99 % В протягом 7 хв. використовували при швидкості потоку 0,35 мл/хв. Обсяг ін'єкції становив 10 мкл. API 4000 працював в режимі контролю множинних реакцій (КМР) на електророзпилювання негативних іонів. Напруга іонного розпилення дорівнювала 4,5 кВ, а вихідна температура дорівнювала 450 °C. Аргон був використаний в якості газу для зіткнень. Енергія зіткнення дорівнювала 34 В. Переходи КМР становили 764.4/331.2 (ПМП-HNS-UA) і 788.3/534.3 (ПМП-внутрішній стандарт). Відносну кількість HNS-UA вираховували по відношенню до рівня внутрішнього стандарту.

#### Результати

Результати дослідження А, показані на Фігурі 6А, ілюструють, що сульфамідаза, модифікована відповідно до нового способу 1, зменшувала рівні HNS-UA в головному мозку на 30 % після повторного внутрішньовенного введення через день протягом 25 днів (13 доз) в дозі 30 мг/кг.

Крім того, лікування за допомогою модифікованої сульфамідази повністю усунуло рівні HNS-UA в печінці (Фігура 6В) і легені (не показано).

Результати дослідження В, показані на Фігурі 6С, ілюструють, що сульфамідаза, модифікована відповідно до нового способу 1, зменшувала рівні HNS-UA в головному мозку на 48 і 14 % після повторного внутрішньовенного введення один раз на тиждень протягом 10 тижнів в дозі 30 мг/кг і 10 мг/кг, відповідно.

Таким чином, ці результати показують, що білок сульфамідази, модифікований відповідно до нового способу 1, описаного в даному документі, призводить, після тривалого лікування, до надійного зниження рівнів HNS-UA в головному мозку, а також, по суті, до повного зниження рівня HNS-UA в периферичних органах.

#### Приклад 9:

##### Оптимізація модифікації сульфамідази

Загалом, процес хімічної модифікації може бути розділений на дві частини, де стадія окислення є першою стадією, що надалі позначається R1, а відновлення є другою стадією, що позначається R2. Для оптимізації цих двох стадій був створений повнофакторний план експерименту (ПЕ), що досліджує вплив температури, концентрації і часу для двох стадій.

##### Матеріали і способи

Сульфамідаза, одержана згідно опису в Прикладі 1, в епісомальній системі експресії Quattromed Cell Factory (QCMF) (Icosagen AS), була модифікована, по суті, відповідно до нового способу 1 з Прикладу 4, однак, параметри, які піддали дослідженню, варіювалися відповідно до Таблиці 4 (нижче). Дослідження R1 виконувалося з однаковим відновленням і дослідженням параметрів, як описано в Прикладі 4 (спосіб 1). Кінцевими точками для аналізу є ступінь окислення гліканів, описана в Прикладі 1, і рівень клітинного поглинання модифікованого білка, описаний в Прикладі 6.

Таблиця 4

Параметри, що відрізняються в R1 і R2

Змінна величина	R1	R2
T (°C)	0, 8, 22	0, 8, 22
t (хв.)	30, 60, 120	30, 60, 120
c (моль/л)	10, 20, 40	1,2×(с в R1), 2,5×(с в R1), 5×(с в R1)

Число параметрів і тип вибраної моделі на виході дають десять експериментів для кожної стадії, результати яких були оцінені з використанням програмного забезпечення MODDE 10 (Umetrics AB).

Крім того, вплив другої стадії гасіння був протестований на сульфамідазі, одержаній з параметрами R1: 8 °C, 60 хв. і 20 мМ метаперіодату натрію. Дві додаткових реакції проводилися паралельно з експериментом відповідно до ПЕ та гасилися з використанням 0,1 М ацетону або додаванням оцтової кислоти до отримання рівня рН 6,0 або нижче. Остаточне дослідження слідувало за схемою для інших реакцій. Сульфамідазу, одержану таким чином, оцінювали за допомогою методу ДСН-ПААГ-електрофорезу, описаного в Прикладі 5.

Дослідження R2 виконувалися на сульфамідазі, модифікованій відповідно до параметрів, що виявилися оптимальними після аналізу ПЕ R1.

Результати

Результати R1 зведені в Таблиці 5 нижче:

Таблиця 5

Дослідження і результати R1

Відмінні параметри			Залишковий оригінальний (природний) N-глікан (%)				Клітинне поглинання
T (°C)	t (хв.)	c (ммоль/л)	N(21)	N(131)	N(244)	N(393)	% поглинання немодифікованої сульфамідази
0	30	10	0	0,9	0	0	12
0	120	10	0	0,4	0	0	9,5
22	30	10	0	0,2	0	0	7,1
22	120	10	0	0,1	0	0	8,5
0	30	40	0	0,3	0	0	3,8
0	120	40	0	0,1	0	0	3,5
22	30	40	0	0,1	0	0	2,7
22	120	40	0	0,01	0	0	3,5
8	60	20	0	0,2	0	0	6,1
8	60	20	0	0,2	0	0	6,5

Крім того, аналіз глікозилювання відповідно до Прикладу 1 був проведений по відношенню до сульфамідази, модифікованої відповідно до відомого методу. Не було виявлено жодних остаточних оригінальних N-гліканів в сайтах N-глікозилювання N(21), N(131), N(244) і N(393).

Оцінка MODDE стадії R1 (окислення) показала, що оптимальними для R1 при температурі близько 8 °C є тривалість реакції близько 1 години і концентрація близько 10 ммоль/л метаперіодату натрію. Загальний стан здоров'я білка (наприклад, структурна цілісність), здається, виграє від найнижчої можливої концентрації окислювача, що до сих пір обмежує клітинне поглинання через рецептори розпізнавання гліканів до рівня нового способу 1 (для одержання більш детальної інформації див. Приклад 6).

Серед різних умов, розкритих для R1, час реакції розглядався в якості важливого параметра для ступеня гліканової модифікації. Крім того, концентрація періодату може впливати на ступінь гліканової модифікації.

Таким чином, в конструкції R2 (відновлення) використовувалися вищевказані переважні параметри для R1, тобто використовувалися для окислення сульфамідази. Критичною кінцевою точкою для R2 є вміст FGly, так як було встановлено, що він має вплив на активність модифікованої сульфамідази (порівняйте Приклади 3 і 5). Результати наведені в Таблиці 6

нижче. Відносну кількість пептидних фрагментів, що містять FGly50 і Ser50, аналізували за допомогою РХ-МС шляхом вимірювання площі піків від реконструйованих іонних хроматограм (без поправки на ефективність іонізації).

Таблиця 6

Зведення ПЕ для R2 та підтверджуючі експерименти

Відмінні параметри			Активний сайт	
t (хв.)	T (°C)	c (ммоль/л)	Формування Ser (%)	Співвідношення FGly/Ser
30	0	12	10	9,0
90	0	12	11	8,1
30	22	12	15	5,7
90	22	12	17	4,9
30	0	50	40	1,5
90	0	50	50	1,0
30	22	50	64	0,6
90	22	50	72	0,4
60	8	25	42	1,4
30	0	20	25	3,0
30	0	50	45	1,2
60	0	15	15	5,7
60	0	25	33	2,0
60	8	12	15	5,7
60	8	50	62	0,6

5

ПЕ для R2 показав, що формування Ser пов'язане з концентрацією боргідриду натрію і температурою. З огляду на формування Ser і наявність форм з високою молекулярною масою (дані не показані, результати аналогічні результатам, що були одержані для нового способу 2 в Прикладі 4), переважними умовами для R2 є: температура близько 0 °C, тривалість реакції близько 1 години або менше і концентрація боргідриду натрію більше 12 ммоль/л і до і включно 50 ммоль/л.

10

В процесі ДСН-ПААГ-електрофорезу (дані не показані) було підтверджено, що сульфамідаза, одержана шляхом реакції, де стадію відновлення гасили, була порівняною з сульфамідазою, одержаною без гасіння. Це вказує на те, що введення другого етапу гасіння не робить негативного впливу на якість матеріалу ані шляхом гасіння за допомогою 0,1 М ацетону, ані при зниженні рівня рН нижче 6 додаванням оцтової кислоти.

15

Приклад 10:

Аналіз гліканової структури після хімічної модифікації сульфамідази відповідно до раніше відомого способу

20

Матеріал і способи

Хімічна модифікація відповідно до відомого способу: Хімічна модифікація сульфамідази відповідно до відомого способу була виконана як описано в Прикладі 2.

Аналіз глікозилювання: Аналіз гліканової структури на сульфамідазі після хімічної модифікації був проведений відповідно до способу РХ-МС, описаному в Прикладі 1.

25

Одержані модифікації на гліканових фрагментах на чотирьох фрагментах триптичних пептидів, що містять сайти N-глікозилювання N(21), N(131), N(244) і N(393), описані в Прикладі 1, були досліджені в процесі аналізу методом РХ-МС.

Результати

30

Аналіз глікозилювання: Як описано в Прикладі 1, тип глікозилювання, знайдений в чотирьох сайтах глікозилювання до хімічної модифікації був переважно представлений комплексними гліканами на N(21) і N(393), та олігоманозним типом гліканів на N(131) і N(244).

Після хімічної модифікації була виконана детальна характеристика модифікованої гліканової структури на найбільш поширених хімічно модифікованих глікопептидах (менш поширені глікани не були виявлені через значне зниження чутливості в результаті збільшення неоднорідності гліканів після хімічної модифікації). У цьому Прикладі була досліджена модифікація на Man-6-глікани після хімічної модифікації відповідно до відомого способу.

35

Періодатна обробка гліканів розщеплює вуглецеві зв'язки між двома сусідніми гідроксильними групами вуглеводних залишків і змінює молекулярну масу гліканового ланцюга. На Фігурі 8А показаний приклад передбачених розривів зв'язків на манозі після хімічної

модифікації. На Фігурі 8В зображена модель Man-6-глікану, що показує теоретичні розриви зв'язків, які можуть мати місце після окислення періодатом натрію.

На Фігурі 9 показані мас-спектри триптичного пептиду N1TR з Man-6 гліканом, прикріпленим до N (131) (T13+Man-6 глікан), до і після хімічної модифікації відповідно до раніше відомого способу. Були визначені іони, що відповідають хімічно модифікованому глікопептидові з різним ступенем розривів зв'язків. У випадку Man-6 глікану, теоретично може бути максимум 3 подвійних розриви зв'язків та один одиночний розрив зв'язків. При виконанні модифікації відповідно до відомого способу було виявлено, що найбільш інтенсивний іонний сигнал в мас-спектрі відповідає двом подвійним розривам зв'язків і 2 одиночним розривам зв'язків, в той час як другий найінтенсивніший іонний сигнал відповідає трьом подвійним розривам зв'язків і одному одинарному розриву зв'язків, який є найбільш розповсюдженим розривом зв'язків з можливих. Діаграма, що візуалізує ступінь розривів зв'язків, виявлених на T13+Man-6 глікані після хімічної модифікації відповідно до відомого способу, зображена на Фігурі 10А (через ізотопний розподіл від іонів, які спостерігаються, результати є приблизними, але порівняльними). Відтворюваність хімічної модифікації тестували з використанням трьох різних партій хімічно модифікованої сульфамідази, одержаної відповідно до раніше відомого способу. Іони, що відповідають різному ступені розриву зв'язків, показали дуже схожий розподіл в мас-спектрах з трьох різних партій.

Приклад 11:

Аналіз гліканової структури після хімічної модифікації сульфамідази відповідно до нових способів 1, 3 і 4.

Нові способи 1, 3 і 4: Хімічні модифікації сульфамідази відповідно до нових способів виконувалася згідно з описом в Прикладі 4.

Аналіз глікозилювання: Аналіз глікозилювання був проведений відповідно до способу РХ-МС, описаного в Прикладі 1. Одержані модифікації на гліканових варіантах чотирьох фрагментів триптичних пептидів, що містять сайти N-глікозилювання N(21), N(131), N(244) і N(393), були досліджені в процесі аналізу методом РХ-МС.

Результати

Аналіз глікозилювання: Детальна характеристика модифікованого гліканового профілю на сульфамідазі, хімічно модифікованій відповідно до нових способів 1, 3 і 4, була виконана на найбільш поширених хімічно модифікованих глікопептидах. У цьому Прикладі 11 була досліджена модифікація на Man-6-глікані після хімічної модифікації відповідно до нових способів 1, 3 і 4.

Були визначені іони, що відповідають хімічно модифікованому глікопептидові T13+Man-6 гліканові з різним ступенем розривів зв'язків. Теоретично, може бути максимум 3 подвійних розриви зв'язків та один одиночний розрив зв'язків (на Фігурі 8В показана модель Man-6 глікану, що демонструє розриви зв'язків, які можуть виникнути після окислення періодатом натрію). При виконанні модифікації відповідно до нового способу 1 було виявлено, що найбільш інтенсивний іонний сигнал в мас-спектрі відповідає одному подвійному розриву зв'язків і 3 одиночним розривам зв'язків, в той час як другий найінтенсивніший іонний сигнал відповідає 2 подвійним розривам зв'язків і 2 одинарним розривам зв'язків. При виконанні модифікації відповідно до нових способів 3 і 4, розриви зв'язків на Man-6 глікані були ще більш зміщені в бік переважно одиночних розривів зв'язків. На Фігурі 10А зображена діаграма, що візуалізує ступінь розривів зв'язків, виявлених на T13+Man-6 глікані після хімічної модифікації.

Відтворюваність хімічної модифікації тестували з використанням трьох екземплярів (новий спосіб 1) або двох екземплярів (новий спосіб 3) хімічно модифікованої сульфамідази.

При порівнянні модифікацій Man-6 глікану, одержаних від сульфамідази, хімічно модифікованої відповідно до відомого способу, з модифікаціями Man-6 глікану, одержаними від сульфамідази, хімічно модифікованої відповідно до нових способів 1, 3 і 4, мала місце велика різниця у ступені розривів зв'язків. Це продемонстровано на Фігурі 10А, де розподіл різних ступенів розривів зв'язків побудований для чотирьох способів (через ізотопний розподіл від іонів, які спостерігаються, результати є приблизними, але порівняльними).

На Фігурі 10В зображена відносна розповсюдженість одиночних розривів зв'язків для використовуваних способів. Раніше відомий спосіб забезпечує модифіковану сульфамідазу, що має 45 % одиночних розривів зв'язків в досліджуваному Man-6-глікані, в той час як нові способи 1, 3 і 4 мають 70, 80 і 82 % одиночних розривів зв'язків, відповідно, після хімічної модифікації.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> СВЕДИШ ОРФАН БІОВІТРУМ АВ (ПАБЛ)

<120> МОДИФІКОВАНА СУЛЬФАМІДАЗА І ІЇ ОДЕРЖАННЯ

<130> 21068924

<160> 3

<170> Версія, що патентується 3.5

<210> 1

<211> 482

<212> ПРТ

<213> Людина розумна

<400> 1

Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu  
15 10 15

Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala lie Ala Thr Pro His Leu Asp Ala  
20 25 30

Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser  
35 40 45

Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gin His  
50 55 60

Gin Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gin Asp Val His His Phe Asn Ser  
65 70 75 80

Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Ser Gin Ala Gly Val  
85 90 95

Arg Thr Gly lie lie Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr  
100 105 110

Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gin Val  
115 120 125

Gly Arg Asn lie Thr Arg lie Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gin  
130 135 140

Thr Gin Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro  
145 150 155 160

His Arg Cys Gly His Ser Gin Pro Gin Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys  
165 170 175

Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg lie Pro Asp Trp Thr Pro  
180 185 190

Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn  
195 200 205

Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly  
210 215 220

Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala  
225 230 235 240

Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val lie Phe Thr Ser Asp Asn Gly lie  
245 250 255

Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu  
260 265 270

Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val  
275 280 285

Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr lie Leu Asp  
290 295 300

Trp Phe Ser lie Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala lie Phe Gly Ser Lys Thr  
305 310 315 320

lie His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro  
325 330 335

Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met  
340 345 350

Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His  
355 360 365

Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro lie Asp Gln Asp Phe Tyr Val  
370 375 380

Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro  
385 390 395 400

Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp  
405 410 415

Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala  
420 425 430

# UA 120432 C2

Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gin Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gin Leu  
435 440 445

Ala Lys Trp Gin Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp  
450 455 460

Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gin Cys Gin Pro Leu His Asn  
465 470 475 480

Glu Leu

<210> 2  
<211> 484  
<212> ПРТ  
<213> Людина розумна

<400> 2

Gly Ser Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly  
15 10 15

Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala lie Ala Thr Pro His Leu  
20 25 30

Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro  
50 55 60

Gin His Gin Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gin Asp Val His His Phe  
65 70 75 80

Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Gin Ala  
85 90 95

Gly Val Arg Thr Gly lie lie Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr  
100 105 110

Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu  
115 120 125

Gin Val Gly Arg Asn lie Thr Arg lie Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe  
130 135 140

Leu Gin Thr Gin Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His  
145 150 155 160

Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gin Pro Gin Tyr Gly Thr Phe Cys  
 165 170 175  
 Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg lie Pro Asp Trp  
 180 185 190  
 Thr Pro Gin Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val  
 195 200 205  
 Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gin Tyr Thr Thr  
 210 215 220  
 Val Gly Arg Met Asp Gin Gly Val Gly Leu Val Leu Gin Glu Leu Arg  
 225 230 235 240  
 Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val lie Phe Thr Ser Asp Asn  
 245 250 255  
 Gly lie Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr  
 260 265 270  
 Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly  
 275 280 285  
 Gin Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr lie  
 290 295 300  
 Leu Asp Trp Phe Ser lie Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala lie Phe Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Thr lie His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala  
 325 330 335  
 Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gin Ser His His Glu Val  
 340 345 350  
 Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gin His Arg His Phe Arg Leu  
 355 360 365  
 Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro lie Asp Gin Asp Phe  
 370 375 380  
 Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gin Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly  
 385 390 395 400  
 Gin Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala  
 405 410 415



Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gin Asn  
420 425 430

Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gin Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp  
435 440 445

Gin Leu Ala Lys Trp Gin Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala  
450 455 460

Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gin Cys Gin Pro Leu  
465 470 475 480

His Asn Glu Leu

<210> 3  
<211> 484  
<212> ПРТ  
<213> Людина розумна

<400> 3

Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu  
15 10 15

Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala lie Ala Thr Pro His Leu Asp Ala  
20 25 30

Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser  
35 40 45

Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gin His  
50 55 60

Gin Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gin Asp Val His His Phe Asn Ser  
65 70 75 80

Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Gin Ala Gly Val  
85 90 95

Arg Thr Gly lie lie Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr  
100 105 110

Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gin Val  
115 120 125

Gly Arg Asn lie Thr Arg lie Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gin  
130 135 140

Thr Gin Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro  
145 150 155 160

His Arg Cys Gly His Ser Gin Pro Gin Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys  
165 170 175

Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg lie Pro Asp Trp Thr Pro  
180 185 190

Gin Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn  
195 200 205

Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gin Tyr Thr Thr Val Gly  
210 215 220

Arg Met Asp Gin Gly Val Gly Leu Val Leu Gin Glu Leu Arg Asp Ala  
225 230 235 240

Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val lie Phe Thr Ser Asp Asn Gly lie  
245 250 255

Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu  
260 265 270

Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gin Val  
275 280 285

Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr lie Leu Asp  
290 295 300

Trp Phe Ser lie Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala lie Phe Gly Ser Lys Thr  
305 310 315 320

lie His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro  
325 330 335

Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gin Ser His His Glu Val Thr Met  
340 345 350

Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gin His Arg His Phe Arg Leu Val His  
355 360 365

Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro lie Asp Gin Asp Phe Tyr Val  
370 375 380

Ser Pro Thr Phe Gin Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gin Pro

```

385                               390                               395                               400
Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp
                               405                               410                               415
Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gin Asn Leu Ala
                               420                               425                               430
Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gin Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gin Leu
                               435                               440                               445
Ala Lys Trp Gin Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp
                               450                               455                               460
Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gin Cys Gin Pro Leu His Asn
465                               470                               475                               480
Glu Leu Gly Ser

```

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Модифікована сульфамідаза, що містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, визначеної в SEQ ID NO: 1, або поліпептид, що має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, визначеною в SEQ ID NO: 1, де природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази руйнуються шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків в олігоманозних гліканах від загального дорівнює принаймні 60 %, зазначена модифікована сульфамідаза не має по суті епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, зазначені епітопи відсутні в чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) зазначеного поліпептиду модифікованої сульфамідази, і де олігоманозний глікан у сайті N-глікозилювання N в положенні 131 (N(131)) руйнується шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків від загального дорівнює принаймні 60 %, таким чином, дозволяючи переносити зазначену сульфамідазу через гематоенцефалічний бар'єр ссавця, де зазначена сульфамідаза має каталітичну активність в головному мозку зазначеного ссавця.
- 10 2. Модифікована сульфамідаза за п. 1, яка **відрізняється** тим, що має відносний вміст природних гліканових фрагментів близько 25 % вмісту природних гліканових фрагментів у немодифікованій рекомбінантній сульфамідазі.
- 15 3. Модифікована сульфамідаза за будь-яким з попередніх пунктів формули, яка **відрізняється** тим, що зазначені епітопи представляють принаймні один тип фрагменту, обраний з фрагмента маноза-6-фосфату, фрагменту манози і фрагменту галактози.
- 20 4. Модифікована сульфамідаза за п. 3, яка **відрізняється** тим, що не містить фрагментів маноза-6-фосфату, фрагментів манози і фрагментів галактози.
- 25 5. Модифікована сульфамідаза за п. 3 або 4, яка **відрізняється** тим, що зазначені епітопи розпізнаються принаймні одним рецептором розпізнавання гліканів, обраним з рецептора маноза-6-фосфату типу 1 і 2, рецептора манози і рецептора галактози.
- 30 6. Модифікована сульфамідаза за будь-яким з попередніх пунктів формули, яка **відрізняється** тим, що зазначена сульфамідаза є неушкодженою в с-термінальній частині, де с-термінальна частина необов'язково представлена амінокислотами 436-484 послідовності SEQ ID NO: 1.
- 35 7. Модифікована сульфамідаза за будь-яким з попередніх пунктів формули, яка **відрізняється** тим, що містить залишок Са-формілгліцину в положенні 50 послідовності SEQ ID NO: 1 (FGly50), який забезпечує зазначену каталітичну активність.
- 40 8. Модифікована сульфамідаза за будь-яким з попередніх пунктів формули, яка **відрізняється** тим, що зазначена каталітична активність забезпечує зниження лізосомного накопичення в головному мозку зазначеного ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення.
9. Модифікована сульфамідаза, яка **відрізняється** тим, що зазначена сульфамідаза містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, визначеної в SEQ ID NO: 1, або поліпептид, що має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою

- послідовністю, визначеною в SEQ ID NO: 1, і зазначена сульфамідаза була одержана шляхом послідовної реакції з періодатом лужного металу і боргідридом лужного металу, тим самим змінюючи епітопи для рецепторів розпізнавання гліканів сульфамідази і знижуючи активність сульфамідази по відношенню до згаданих рецепторів, при збереженні каталітичної активності
- 5 зазначеної сульфамідази в головному мозку ссавця, де природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази руйнуються шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків в олігоманозних гліканах від загального дорівнює принаймні 60 %, зазначена модифікована сульфамідаза не має по суті епітопів для
- 10 рецепторів розпізнавання гліканів, зазначені епітопи відсутні в чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) зазначеного поліпептида модифікованої сульфамідази, і де олігоманозний глікан у сайті N-глікозилювання N в положенні 131 (N(131)) руйнується шляхом
- 15 одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків від загального дорівнює принаймні 60 %.
10. Композиція сульфамідази, що містить модифіковану сульфамідазу, яка містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, визначеної в SEQ ID NO: 1, або поліпептид, що має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, визначеною в SEQ ID NO: 1, де природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази
- 20 руйнуються шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків в олігоманозних гліканах від загального дорівнює принаймні 60 %, зазначена модифікована сульфамідаза не має, по суті, епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, зазначені епітопи відсутні в чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: N в положенні 21 (N(21)), N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393))
- 25 зазначеного поліпептида модифікованої сульфамідази, і де олігоманозний глікан у сайті N-глікозилювання N в положенні 131 (N(131)) руйнується шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків від загального дорівнює принаймні 60 %, таким чином, дозволяючи перенесення зазначеної сульфамідази через гематоенцефалічний бар'єр ссавця, і співвідношення Ca-формілгліцину (FGly) і серину (Ser) в активному сайті більше ніж 1, забезпечуючи тим самим каталітичну активність в головному
- 30 мозку зазначеного ссавця.
11. Композиція сульфамідази за п. 10, яка **відрізняється** тим, що містить модифіковану сульфамідазу, як визначено у будь-якому з пп. 1-9.
12. Композиція сульфамідази за будь-яким з пп. 10 або 11, яка **відрізняється** тим, що містить не більше 5 % (масової частки) сульфамідази в мультимірних формах, що мають молекулярну
- 35 масу близько  $10^{10}$  кДа.
13. Спосіб одержання модифікованої сульфамідази, де зазначений спосіб включає:
- a) реакцію глікозилюваної сульфамідази з періодатом лужного металу, і
- b) реакцію зазначеної сульфамідази з боргідридом лужного металу протягом періоду часу не
- 40 більше 2 годин;
- тим самим модифікуючи гліканові фрагменти сульфамідази і знижуючи активність сульфамідази по відношенню до рецепторів розпізнавання гліканів, зі збереженням каталітичної активності зазначеної сульфамідази в головному мозку ссавця.
14. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що зазначений боргідрид використовується в концентрації від 10 до 80 мМ.
- 45 15. Спосіб за будь-яким з пп. 13 або 14, який **відрізняється** тим, що стадію а) виконують протягом періоду часу не більше 4 годин, наприклад не більше 3 годин, наприклад не більше 2 годин, наприклад не більше 1 години, наприклад близько 0,5 годин.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 13-14, який **відрізняється** тим, що стадію а) і стадію b) виконують послідовно, без виконання проміжної стадії.
- 50 17. Спосіб за будь-яким з пп. 13-16, який **відрізняється** тим, що стадія а) додатково характеризується принаймні одним з, наприклад принаймні двома з, наприклад всіма підпунктами i)-iii):
- i) зазначений періодат лужного металу є метаперіодатом натрію;
- ii) зазначений періодат використовується в концентрації максимум 20 мМ, наприклад максимум
- 55 15 мМ, наприклад близько 10 мМ, і
- iii) зазначену реакцію виконують при температурі від 0 до 22 °C, наприклад при температурі від 0 до 8 °C, наприклад при температурі від 0 до 4 °C, наприклад близько 8 °C, наприклад близько 0 °C.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 13-17, який **відрізняється** тим, що зазначена реакція зі стадії а) виконується при рівні pH від 3 до 7.
- 60

19. Спосіб за будь-яким з пп. 13-18, який **відрізняється** тим, що стадія b) додатково характеризується принаймні одним з, наприклад принаймні двома з, наприклад всіма підпунктами i)-iv):

i) зазначений боргідрид лужного металу є боргідридом натрію;

5 ii) зазначений боргідрид використовується в концентрації, що не більше ніж в 4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад не більше ніж в 3 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад не більше ніж в 2,5 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату, наприклад не більше ніж в 0,5-4 рази, перевищує концентрацію зазначеного періодату;

10 iii) зазначену реакцію виконують протягом періоду часу не більше 1,5 години, наприклад не більше 1 години, наприклад не більше 0,75 години, наприклад близько 0,5 години, і

iv) зазначену реакцію виконують при температурі від 0 до 8°C.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 13-19, який **відрізняється** тим, що кожна зі стадії a) і стадії b) окремо виконується протягом періоду часу, що не перевищує 2 години, а зазначений боргідрид 15 не обов'язково використовується в концентрації, що в 0,5-4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату.

21. Спосіб за будь-яким з пп. 13-20, який **відрізняється** тим, що стадію a) виконують протягом періоду часу не більше 3 годин, а стадію b) виконують протягом періоду часу, що не перевищує 1 години, а зазначений боргідрид використовується не обов'язково в концентрації, що в не 20 більше ніж 4 рази перевищує концентрацію зазначеного періодату.

22. Спосіб за будь-яким з пп. 13-21, який **відрізняється** тим, що додатково містить стадію a2) гасіння реакції, що витікає зі стадії a).

23. Спосіб за будь-яким з пп. 13-22, який **відрізняється** тим, що додатково містить стадію b2) гасіння реакції, що витікає зі стадії b).

25 24. Спосіб за будь-яким з пп. 13-23, який **відрізняється** тим, що зазначений поліпептид глікозилованої сульфамідази містить гліканові фрагменти в принаймні чотирьох залишках аспарагіну.

25. Спосіб за п. 24, який **відрізняється** тим, що зазначений періодат лужного металу окислює c/s-гліколеві групи гліканових фрагментів до альдегідних груп.

30 26. Спосіб за п. 25, який **відрізняється** тим, що зазначений боргідрид лужного металу відновлює зазначені альдегіди до спиртів.

27. Модифікована сульфамідаза або композиція сульфамідази за будь-яким з пп. 1-12 для використання в терапії.

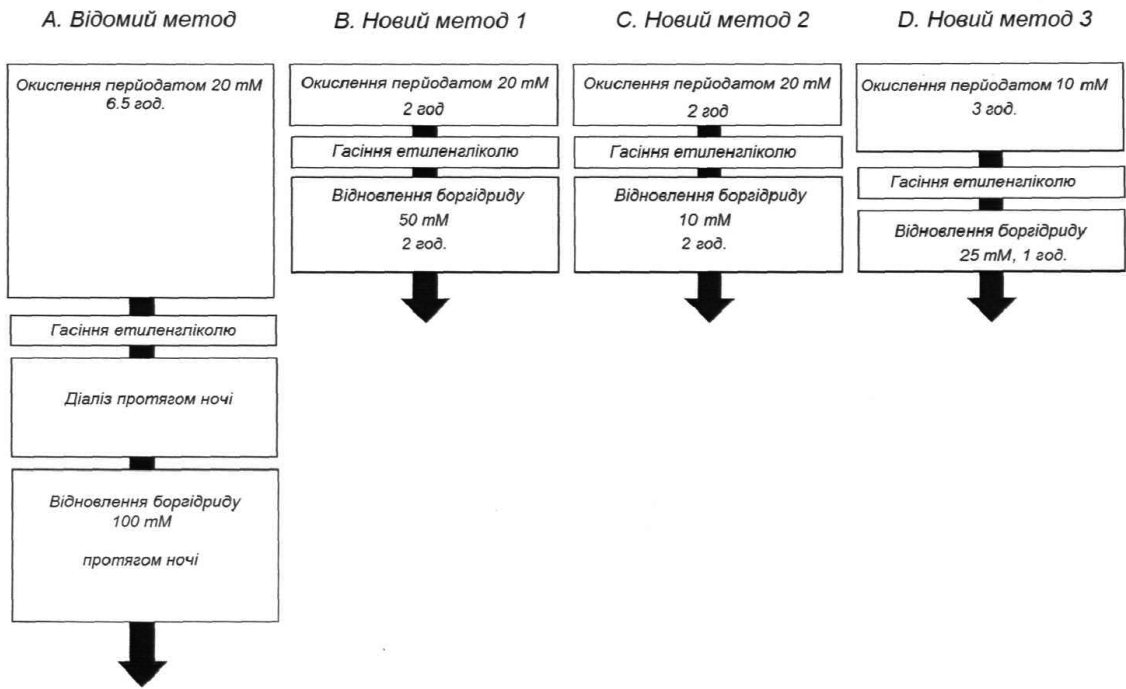
35 28. Модифікована сульфамідаза або композиція сульфамідази за п. 27 для використання в лікуванні ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення, зокрема від мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA).

29. Спосіб лікування ссавця, який страждає від лізосомної хвороби накопичення, наприклад від мукополісахаридозу типу IIIA (МПС IIIA), що включає введення ссавцю терапевтично ефективної дози модифікованої сульфамідази, де зазначена модифікована сульфамідаза 40 вибирається з:

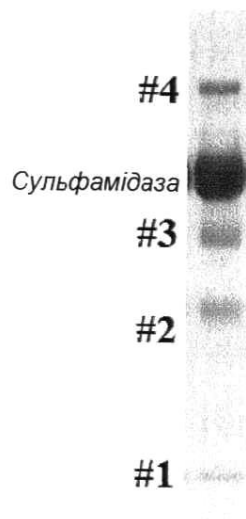
a) модифікованої сульфамідази за будь-яким з пп. 1-9;

b) композиції сульфамідази за будь-яким з пп. 10-12, і

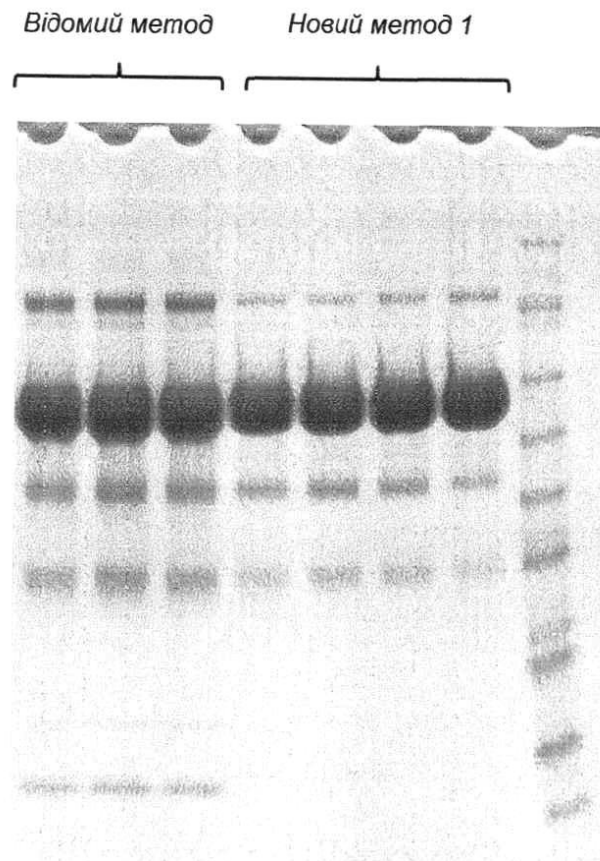
45 c) модифікованої сульфамідази, яка містить поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності, визначеної в SEQ ID NO: 1, або поліпептид, що має принаймні 95 % ідентичності послідовностей з амінокислотою послідовністю, визначеною в SEQ ID NO: 1, де модифікація включає послідовну обробку зазначеної модифікованої сульфамідази за допомогою періодату лужного металу і боргідриду лужного металу, в результаті чого гліканові фрагменти сульфамідази є хімічно модифіковані таким чином, щоб зменшити її активність відносно рецепторів розпізнавання гліканів, зі збереженням каталітичної ферментативної активності в 50 головному мозку ссавця, де природні гліканові фрагменти зазначеної сульфамідази руйнуються шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків в олігоманозних гліканах від загального дорівнює принаймні 60 %, зазначена модифікована сульфамідаза не має по суті епітопів для рецепторів розпізнавання гліканів, зазначені епітопи відсутні в чотирьох з п'яти сайтів N-глікозилювання: N в положенні 21 (N(21)), 55 N в положенні 122 (N(122)), N в положенні 244 (N(244)) і N в положенні 393 (N(393)) зазначеного поліпептиду модифікованої сульфамідази, і де олігоманозний глікан у сайті N-глікозилювання N в положенні 131 (N(131)) руйнується шляхом одиничних розривів зв'язків і подвійних розривів зв'язків, причому ступінь одиничних розривів зв'язків від загального дорівнює принаймні 60 %.



ФІГ. 1



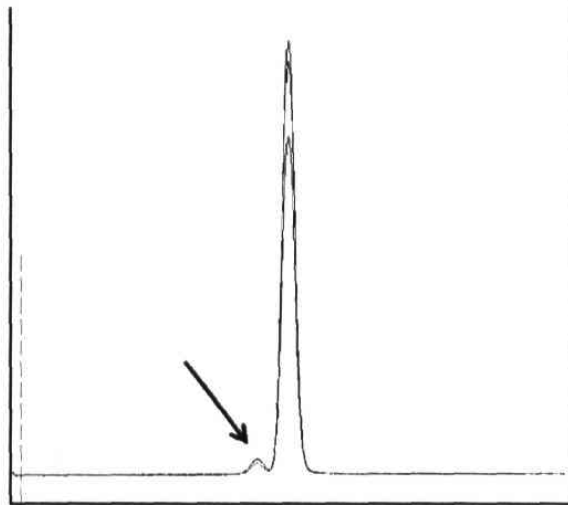
ФІГ. 2A



**ФІГ. 2В**

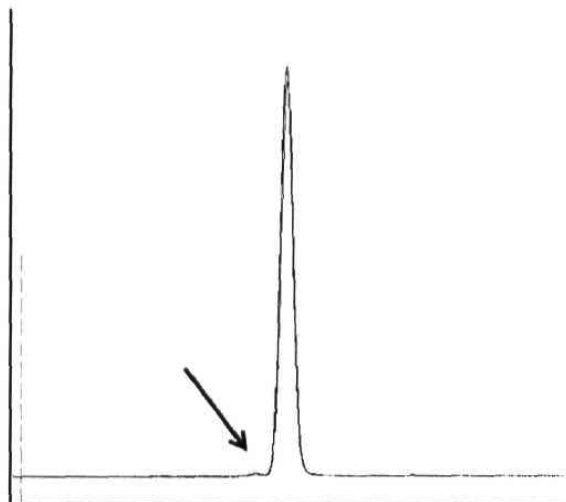
A

*Відомий метод*



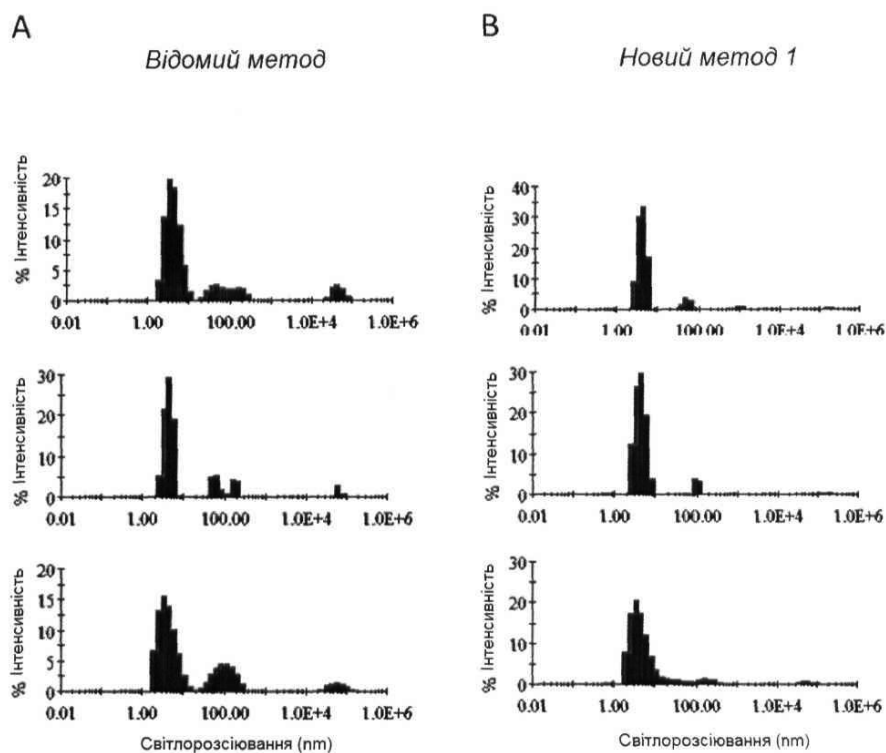
B

*Новий метод 1*

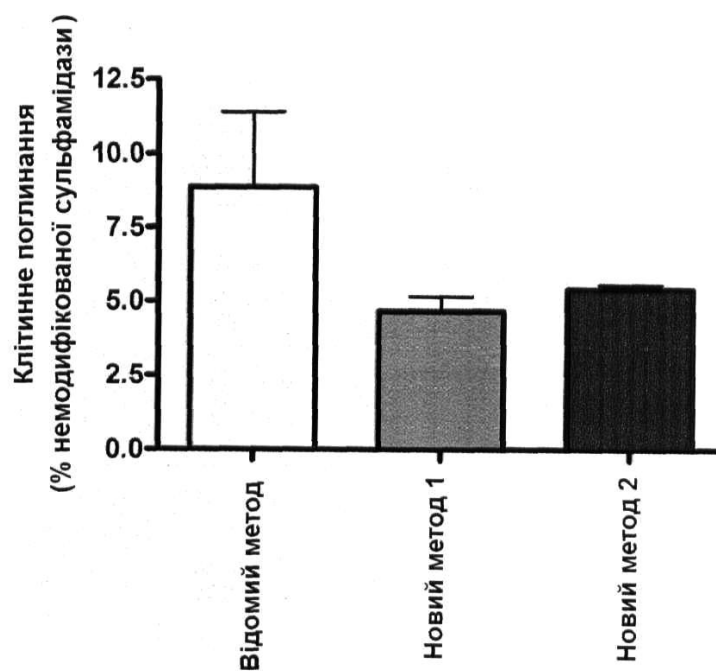


**ФІГ. 3**

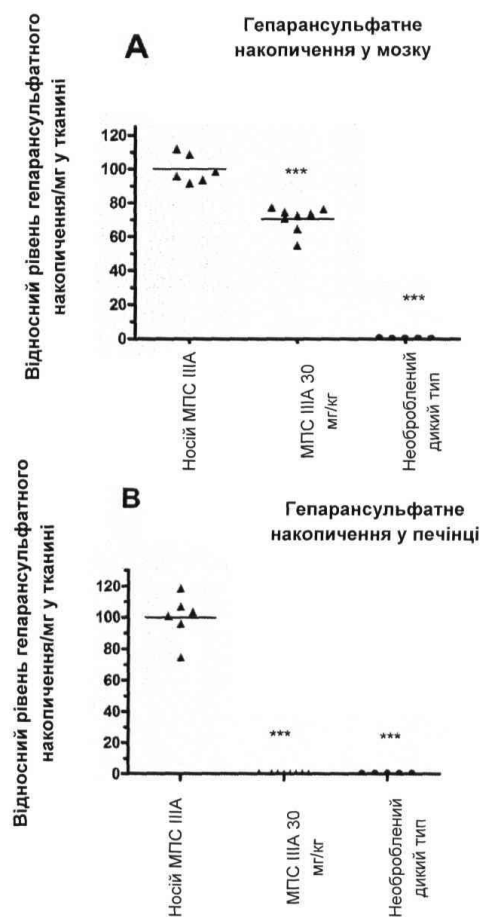




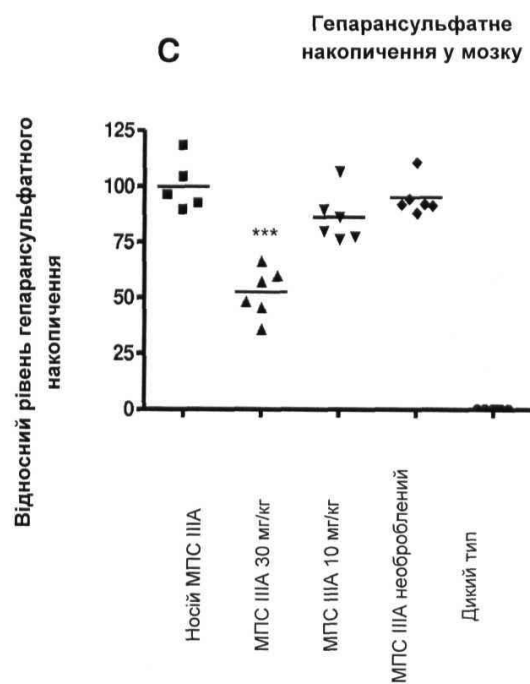
ФІГ. 4



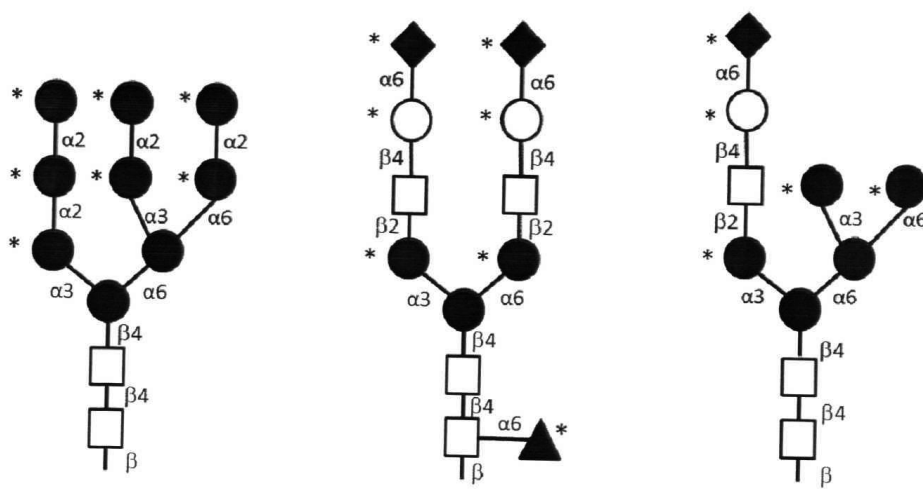
ФІГ. 5



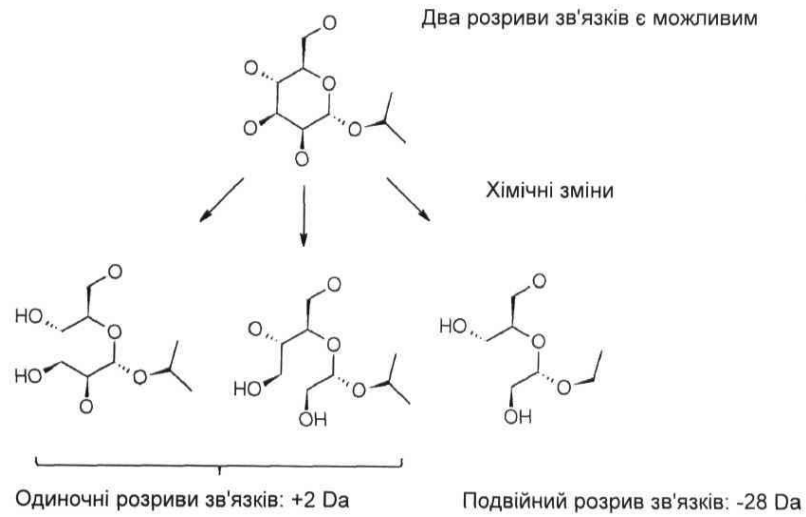
ФІГ. 6



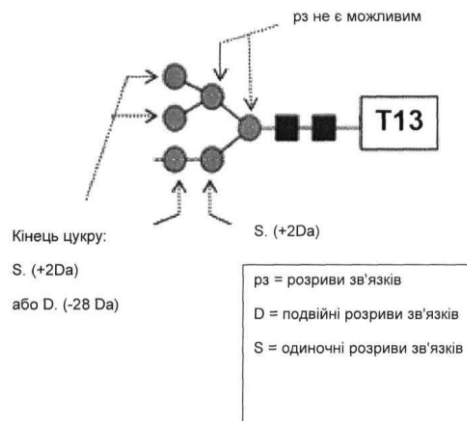
ФІГ. 6



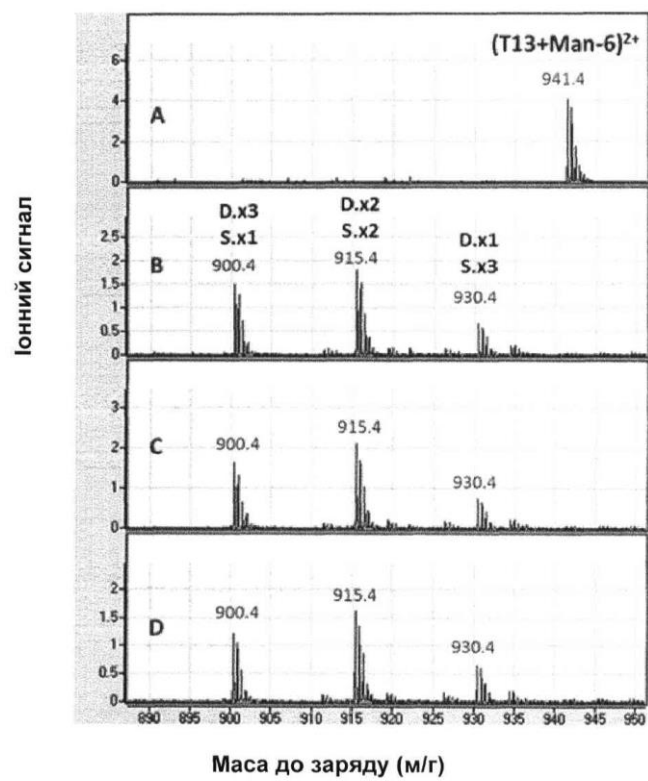
ФІГ. 7



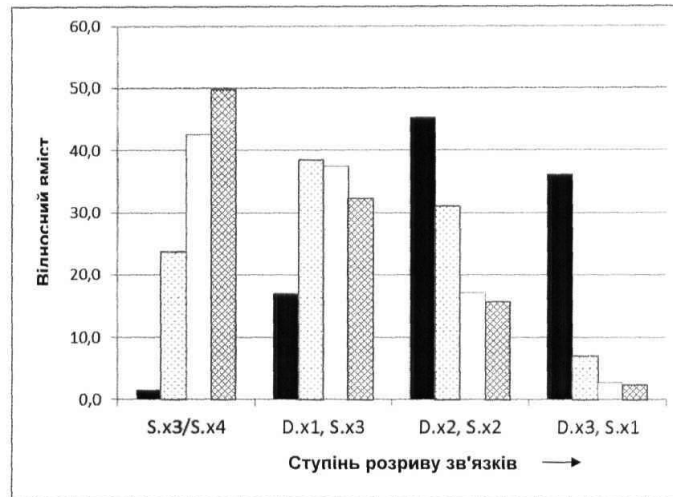
ФІГ. 8А



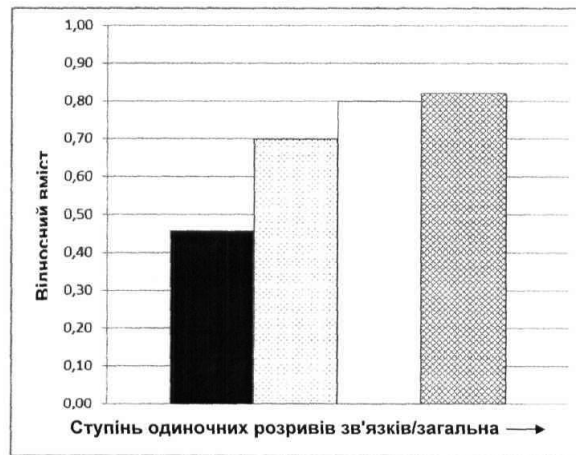
ФІГ. 8В



ФІГ. 9



**A**



**B**

ФІГ. 10

SEQ ID NO:	Амінокислотна послідовність	Назва
1	RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG MYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYYPDFAYTEENGSLQVGRNITRI KLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDV LVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYW PGTAEP LLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAEP LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRVLHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTG WYKDLRHYYYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSPPCQPLHNEL	PBV2351
2	GSRPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG NGMYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYYPDFAYTEENGSLQVGRNITRI TRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPDWTPQAYDPL DVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYW YWPGEPLLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAEP EPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRVLHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTG TGWYKDLRHYYYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPD GVLEEKLSPPCQPLHNEL	pBV1968
3	RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG MYGLHQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYYPDFAYTEENGSLQVGRNITRI KLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDV LVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYW PGTAEP LLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAEP LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRVLHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTG WYKDLRHYYYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSPPCQPLHNELGS	pBV1803

ФІГ. 11

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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