

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034515**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.14

(51) Int. Cl. **C12N 9/40** (2006.01)
A61K 35/18 (2015.01)

(21) Номер заявки
201690826

(22) Дата подачи заявки
2014.10.22

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГЛИКОПРОТЕИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/894,879; 61/901,942**

(32) **2013.10.23; 2013.11.08**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/061789**

(87) **WO 2015/061464 2015.04.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Ли Карен, Хванг Кристофер, Демария
Кристин (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) YOUNGSOO SOHN ET AL.: "Enhanced sialylation and in vivo efficacy of recombinant human [alpha]-galactosidase through in vitro glycosylation", BMB REPORTS, vol. 46, no. 3, 31 March 2013 (2013-03-31), pages 157-162, XP055167240, ISSN: 1976-6696, DOI: 10.5483/BMBRep.2013.46.3.192, the whole document

US-A-6083725

US-A-5356804

LEE KAREN ET AL.: "A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 13, no. 4, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 305-313, XP002489129, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/GLYCOB/CWG034, cited in the application, the whole document

MATSUURA ET AL.: "Human alpha-galactosidase A: characterization of the N-linked oligosaccharides on the intracellular and secreted glycoforms overexpressed by Chinese hamster ovary cells", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 8, no. 4, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 329-339, XP000925912, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/GLYCOB/8.4.329, the whole document

IOANNOU Y.A. ET AL.: "OVEREXPRESSION OF HUMAN ALPHA-GALACTOSIDASE A RESULTS IN ITS INTRACELLULAR AGGREGATION, CRYSTALLIZATION IN LYSOSOMES, AND SELECTIVE SECRETION", THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY: JCB, THE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 119, no. 5, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 1137-1150, XP000616658, ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/JCB.119.5.1137, the whole document

(57) В настоящем изобретении предлагаются рекомбинантные гликопротеиды (например, рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека) с измененным (например, улучшенным) профилем гликозилирования, и фармацевтические композиции и наборы, содержащие один или несколько из таких белков. Также предлагаются способы создания клетки млекопитающего, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида (например, рекомбинантной α -галактозидазы-А человека), способы получения рекомбинантных гликопротеидов и способы лечения, которые включают в себя введение субъекту по меньшей мере одного из рекомбинантных гликопротеидов (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека).

034515 B1

034515 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США с регистрационным номером 61/894879, поданной 23 октября 2013 г., и предварительной заявки на выдачу патента США с регистрационным номером 61/901942, поданной 8 ноября 2013 г.; полное содержание которых включено в настоящее описание в виде ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и, более конкретно, к получению рекомбинантных гликопротеидов (например, рекомбинантной α -галактозидазы-А человека) и к лечению лизосомных болезней накопления (например, болезни Фабри) у субъекта.

Уровень техники

Лизосомные болезни накопления представляют собой группу из более чем 40 расстройств, которые являются результатом дефектов генов, кодирующих ферменты, которые разрушают гликопротеидные или полисахаридные продукты обмена в лизосомах клеток. Затем ферментативные продукты, например сахара и липиды, перерабатываются в новые продукты. Каждое из таких расстройств является результатом наследуемого аутосомного или X-сцепленного рецессивного признака, который влияет на уровни ферментов в лизосоме. Обычно биологическая или функциональная активность таких ферментов в клетках или тканях у пораженных индивидуумов понижена или отсутствует. Список примеров лизосомных болезней накопления и ассоциированная недостаточность ферментов показаны на фиг. 1 и описаны в табл. 1 патента США № 6066626. При таких заболеваниях недостаточность функции ферментов создает прогрессирующее системное отложение липидного или углеводного субстрата в лизосомах клеток в организме, в итоге вызывая утрату функции органов и гибель.

Болезнь Фабри является лизосомной болезнью накопления, вызываемой недостаточностью лизосомного фермента α -галактозидазы-А. Недостаточность такой лизосомной гидролазы приводит к прогрессирующему отложению гликофинголипида глоботриаозилцерамида (GL3) и родственных липидов в большинстве тканей организма. Отложения GL3 главным образом встречаются в эндотелии сосудов. Прогессирующее накопление в эндотелии GL3 приводит к ишемии и инфаркту органов, таких как почка, сердце или головной мозг, вызывая мучительную боль, почечную недостаточность и заболевания сердца и нарушения мозгового кровообращения. Средняя продолжительность жизни пациента с болезнью Фабри без лечения с использованием ферментной заместительной терапии из-за осложнений заболевания сосудов в почках, сердце и/или головном мозгу составляет 50 лет для мужчин и 70 лет для женщин (Lidove et al., Int. J. Clin. Pract. 61: 293-302, 2007).

Рекомбинантные белки для применения в лечении часто получают способами на основе культивирования клеток, которые включают в себя применение жидкой среды, которая содержит полученный из крови продукт (например, сыворотку или плазму животного, отличного от человека). Загрязнения фармацевтических продуктов, содержащих рекомбинантные белки, представляли проблему для биотехнологической промышленности (Nims, BioProcessing J. 10: 4-10, 2011; Plavsic et al., BioProcessing J. 9: 6-12, 2011; Plavsic et al., Dev. Biol. Stand 99: 95-109, 1999). Например, присутствие ряда разных вирусов в таких фармацевтических продуктах, в некоторых случаях, обусловлено полученным из крови продуктом (например, сывороткой или плазмой животного, отличного от человека), присутствующим в жидкой среде, используемой для культивирования клеток, которые продуцируют рекомбинантный белок. Примеры загрязняющих примесей, которые были найдены в культурах клеток, продуцирующих рекомбинантный белок, и которые, как полагают, вызваны применением животных продуктов (например, сыворотки животных, плазмы животных или сывороточных белков животных), описаны в настоящей публикации. Целесообразно применение бессывороточной среды или среды, не содержащей животных продуктов, для культивирования клеток, продуцирующих рекомбинантный белок, так как культуральная среда является более определенной и простой, в меньшей степени загрязнена примесями, исключает или снижает риск контаминации или уровень контаминантов в культуре клеток, продуцирующих рекомбинантный белок, и приводит к снижению стоимости получения рекомбинантного белка с использованием культуры клеток.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение, по меньшей мере, отчасти, основано на открытии того, что белки (например, ферменты, например, α -галактозидаза-А) с измененным (например, улучшенным) профилем гликозилирования могут быть получены с применением способов, описанных в настоящей публикации. Соответственно, в настоящем изобретении предлагаются белки α -галактозидазы-А с пониженной вариабельностью гликоформ, с пониженным риском или уровнем контаминации (например, пониженным риском или уровнем вирусной контаминации), и/или измененными и улучшенными профилями гликозилирования (например, по сравнению с ранее производимыми ферментами для ферментной заместительной терапии), фармацевтические композиции и наборы, которые содержат один или несколько таких белков α -галактозидазы-А (например, фармацевтические композиции, которые имеют пониженную вариабельность гликоформ и/или пониженный риск или уровень контаминации (например, пониженный риск или уровень вирусной контаминации)), способы создания клетки млекопитающего, применимой для рекомбинантной экспрессии гликопротеида (например, α -галактозидазы-А), способы получения рекомбинант-

ного гликопротеида (например, α -галактозидазы-А), способы лечения болезни Фабри и способы снижения уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке у субъекта, и способы повышения уровня α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего (например, клетке *in vitro* или клетке в организме субъекта). Также предлагаются экспрессирующие векторы, которые включают в себя последовательность, кодирующую белки α -галактозидазы-А.

В настоящем изобретении предлагаются рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека (rhAGA), имеющие один или оба структурных признака: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 1,5%; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет более чем примерно 9%. Например, белок rhAGA по п.1 может иметь структурный признак: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 1,5%; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет более чем примерно 9%. В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 1,3% (например, примерно от 0,1 до примерно 1,0%, или примерно от 0,1 до примерно 0,7%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет более чем примерно 8,5% (например, более чем примерно 9,0%).

Белки rhAGA, предлагаемые в настоящем изобретении, могут дополнительно иметь один или несколько структурных признаков, выбранных из следующей группы: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет более чем примерно 13,5%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 2, которое составляет более чем примерно 2,0%; и соотношение моль/моль сиаловая кислота/белок, которое составляет более чем примерно 3,0. Например, белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, может дополнительно иметь следующие структурные признаки: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет более чем примерно 13,5%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 2, которое составляет более чем примерно 2,0%; и соотношение моль/моль сиаловая кислота/белок, которое составляет более чем примерно 3,0. В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет более чем примерно 13,8% (например, больше чем примерно 14,0%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 2, которое составляет более чем примерно 4% (например, больше чем примерно 6%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет соотношение моль/моль сиаловая кислота/белок, которое составляет более чем примерно 3,2 (например, больше чем примерно 3,4).

Белки rhAGA, предлагаемые в настоящем изобретении, могут дополнительно иметь один или несколько структурных признаков, выбранных из группы: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 3,9%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 3,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 5,3%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 1, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 9,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет примерно от 1 до примерно 7,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 14,8%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиалилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 4,9%; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 8,2%. Например, белок rhAGA, описанный в настоящей публикации, может иметь четыре или более структурных признака, выбранных из группы: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 3,9%; про-

центное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 3,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиаилированные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 5,3%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 1, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 9,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет примерно от 1 до примерно 7,0%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 14,8%; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиаилилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 4,9%; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 8,2%. В некоторых вариантах, белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды, которое составляет примерно от 0,1 до примерно 3,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 2,0%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет примерно от 1,0 до примерно 2,0% (например, примерно от 1,5 до примерно 2,0%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиаилилированные олигосахариды, которое составляет примерно от 3,0 до примерно 5,0% (например, примерно от 4,0 до примерно 5,0%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 1, которое составляет примерно от 0,5 до примерно 8,0% (например, примерно от 0,5 до примерно 5,0%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет примерно от 4 до примерно 6,9% (например, примерно от 5 до примерно 6,8%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 15% (например, больше чем примерно 16%). В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиаилилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 6%. В некоторых вариантах белок rhAGA имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем примерно 8,5% (например, больше чем примерно 9,0%).

Белки rhAGA, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь один или оба следующих свойства: (i) повышенный эндоцитоз клеткой млекопитающего, экспрессирующей белок рецептора манноза-6-фосфата, по сравнению с Fabrazyme®; и (ii) повышенную аффинность к белку рецептора манноза-6-фосфата, по сравнению с Fabrazyme®. Например, белки rhAGA, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь (i) повышенный эндоцитоз клеткой млекопитающего, экспрессирующей белок рецептора манноза-6-фосфата, по сравнению с Fabrazyme®; и (ii) повышенную аффинность к белку рецептора манноза-6-фосфата по сравнению с Fabrazyme®.

Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может не иметь регистрируемого уровня или не иметь белка, липида, углевода, нуклеиновой кислоты и контаминанта (например, любого из контаминантов, описанных в настоящей публикации), присутствующих в животном продукте (например, сыворотке животного, плазме животного или продукте, полученном из крови животного).

Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, полученный в культуре клеток, в которой используют только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной среды. Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, полученный в культуре клеток, в которой используют только не содержащую белка и/или химически определенную среду. Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, полученный в культуре клеток, в которой используют только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной среды, и выделенный с использованием интегрированного и непрерывного способа. В некоторых вариантах интегрированный и непрерывный способ включает в себя стадии: (а) получения жидкой культуральной среды, содержащей белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, которая по существу не содержит клеток, при этом жидкую культуральную среду подают в первую, состоящую из множества колонок хроматографическую систему (MCCS1); (b) улавливания белка rhAGA в жидкой среде с использованием MCCS1, при этом элюат MCCS1, содержащий рекомбинантный терапевтический белок непрерывно подают во вторую, содержащую несколько колонок, хромато-

графическую систему (MCCS2); и (с) очистки и доочистки рекомбинантного терапевтического белка с использованием MCCS2, при этом элюат из MCCS2 является лекарственным веществом rhAGA, и при этом способ интегрирован и осуществляется непрерывно, начиная с жидкой культуральной среды до элюата из MCCS2, который является лекарственным веществом rhAGA. В некоторых вариантах MCCS1 и/или MCCS2 осуществляют две разных элементарных операции. В некоторых вариантах применение MCCS1 или MCCS2 или обеих систем включает в себя переключение колонок. В некоторых вариантах MCCS1 осуществляет элементарные операции улавливания рекомбинантного белка и инактивации вирусов. В некоторых вариантах MCCS2 осуществляет элементарные операции очистки и доочистки рекомбинантного терапевтического белка. В некоторых вариантах в MCCS1 и/или MCCS2 используют по меньшей мере две хроматографические колонки. В некоторых вариантах MCCS1 представляет собой первую периодическую противоточную хроматографическую систему (PCCS1), например, PCCS1, которая включает состоящую из четырех колонок PCCS. В некоторых вариантах три из четырех колонок в состоящей из четырех колонок PCCS (в варианте PCCS1) осуществляет элементарную операцию улавливания рекомбинантного терапевтического белка из жидкой культуральной среды. В некоторых вариантах элюат, содержащий белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, с трех из четырех колонок в состоящей из четырех колонок PCC1 (в одном варианте PCCS1), подают на четвертую колонку состоящей из четырех колонок PCCS. В некоторых вариантах четвертая колонка состоящей из четырех колонок PCCS (в одном варианте PCCS1) осуществляет элементарную операцию инактивации вирусов посредством удерживания элюата, содержащего рекомбинантный терапевтический белок, при низком значении pH для инактивации вирусов. В некоторых вариантах осуществляют корректировку pH элюата с четвертой колонки состоящей из четырех колонок PCCS с использованием встроенной в систему емкости для корректировки буфера перед тем как элюат с четвертой колонки состоящей из четырех колонок PCCS подают в PCCS2. В некоторых вариантах PCCS2 содержит три хроматографических колонки и хроматографическую мембрану. В некоторых вариантах три хроматографических колонки в PCCS2 осуществляют элементарную операцию очистки rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, из элюата PCCS1 посредством катионообменной или анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах элюат с трех хроматографических колонок в PCCS2 подают на хроматографическую мембрану в PCCS2. В некоторых вариантах хроматографическая мембрана в PCCS2 осуществляет элементарную операцию доочистки белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, в элюате с трех хроматографических колонок в PCCS2 посредством катионообменной или анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах хроматографическая мембрана в PCCS2 осуществляет элементарную операцию доочистки посредством катионного обмена. В некоторых вариантах проходящий элюат и промывка с хроматографической мембраны в PCCS2 представляет собой лекарственное вещество rhAGA.

Также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие любой белок rhAGA, описанный в настоящей публикации, и фармацевтически приемлемый носитель. Например, фармацевтическая композиция может быть приготовлена для внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интрадермального, подкожного или внутрибрюшинного введения. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция содержит rhAGA в концентрации примерно от 4 мг/мл до примерно 6 мг/мл (например, примерно 5 мг/мл). В некоторых примерах фармацевтическая композиция представляет собой стерильный лиофилизированный порошок. В некоторых вариантах фармацевтически приемлемым носителем может быть одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из маннита, одноосновного фосфата натрия, моногидрата, двухосновного фосфата натрия, гептагидрата.

Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может не иметь регистрируемой метки или не иметь белка, липида, углевода, нуклеиновой кислоты и контаминанта (например, любого из контаминантов, описанных в настоящей публикации), присутствующих в животном продукте (например, в сыворотке животного, плазме животного или продукте, полученном из крови животного).

Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован в культуре клеток, в которой использована только культуральная среда, выбранная из группы не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной среды. Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован в культуре клеток, в которой использована только не содержащая белка культуральная среда и/или химически определенная культуральная среда. Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован в культуре клеток, в которой использована только культуральная среда, выбранная из группы не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной культуральной среды, и выделен с применением интегрированного и непрерывного способа (например, с применением любого из приведенных в качестве примера интегрированных и непрерывных способов, описанных в настоящей публикации).

Также предлагаются экспрессирующие векторы, содержащие: последовательность, которая кодирует рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека; промоторную последовательность, оперативно

связанную с 5'-концом последовательности, кодирующей белок α -галактозидазы-А человека; последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека, со стартовым кодоном TTG, оперативно связанную с 5'-концом последовательности, кодирующей белок α -галактозидазы-А человека; и последовательность, кодирующую сайт узнавания поли(А), оперативно связанную с 3'-концом последовательности, кодирующей белок α -галактозидазы-А человека. В некоторых вариантах промоторная последовательность выбрана из группы, состоящей из промотора gpS21 хомячка, промотора β -актина хомячка и раннего промотора SV40; и последовательность, кодирующая сайт узнавания поли(А) представляет собой раннюю последовательность узнавания поли(А) SV40. В некоторых вариантах экспрессирующий вектор дополнительно содержит последовательность, кодирующую глутаминсинтетазу человека и собаки или дигидрофолатредуктазу. В некоторых вариантах 5'-конец последовательности, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки, оперативно связан с ранним промотором SV40, и 3'-конец последовательности, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки или дигидрофолатредуктазу, оперативно связан с ранним интроном SV40 и сигнальной поли(А)-последовательностью.

Также предлагаются способы создания линии клеток млекопитающих, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида, которые включают в себя (а) получение зависимой от сыворотки иммортализованной линии клеток млекопитающего; (b) последующее культивирование линии клеток млекопитающего в: (1) среде для культивирования клеток, содержащей первую концентрацию (1x) сыворотки животного, в течение примерно от 5 суток до примерно 10 суток; (2) среде для культивирования клеток, содержащей концентрацию сыворотки животного примерно от 0,2X до примерно 0,3X в течение примерно от 5 суток до примерно 10 суток; и (3) среде для культивирования клеток, содержащей примерно от 0,01X до примерно 0,08X сыворотки животного, в течение примерно от 5 суток до примерно 10 суток; (c) создание культур из субклонов отдельных клеток из культуры после стадии (b); (d) отбор субклона, полученного на стадии (c), который имеет приемлемую эффективность трансформации, рост клеток в не содержащей сыворотки культуральной среде и экспрессию рекомбинантного белка; (e) культивирование отобранного субклона (d) в не содержащей белка, не содержащей сыворотки, химически определенной среде в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 суток до примерно 25 суток, примерно от 5 суток до примерно 20 суток, примерно от 5 суток до примерно 15 суток или примерно от 5 суток до примерно 10 суток); (f) создание культур субклонов из одиночных клеток из культуры после стадии (d); и (g) отбор субклона, полученного на стадии (e), который имеет приемлемую эффективность трансформации, пиковую плотность клеток, ростовые свойства, показатель объемной продуктивности (VPR) и профиль гликозилирования гликопротеида, при этом субклон, отобранный на стадии (f), применим для экспрессии рекомбинантного гликопротеида. Также предлагаются способы создания линии клеток млекопитающего, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида, которые включают в себя: (а) получение зависимой от сыворотки иммортализованной линии клеток млекопитающего; (b) последующее культивирование линии клеток млекопитающего в: (1) среде для культивирования клеток, содержащей первую концентрацию (1X) сыворотки животного, в течение примерно от 1 суток до примерно 10 суток (например, примерно 3 суток); (2) среде для культивирования клеток, содержащей примерно от 0,2X до примерно 0,6X концентрацию (например, 0,5X) сыворотки животного, в течение примерно от 1 суток до примерно 10 суток (например, примерно 3 суток); и (3) среде для культивирования клеток, содержащей от 0X до примерно 0,10X сыворотки животного, в течение примерно от 5 суток до примерно 10 суток (например, примерно 8 суток); (c) создание культур субклонов из отдельных клеток из культуры после стадии (b); (d) отбор субклона, полученного на стадии (c), который имеет приемлемую эффективность трансформации, рост клеток в не содержащей сыворотки культуральной среде и экспрессию рекомбинантного белка; (e) создание культур субклонов из отдельных клеток из субклона, отобранного на стадии (d); и (f) отбор субклона со стадии (e), который имеет приемлемую эффективность трансформации, пиковую плотность клеток, ростовые свойства, показатель объемной продуктивности (VPR) и экспрессию рекомбинантного белка, при этом субклон, отобранный на стадии (f), применим для экспрессии рекомбинантного гликопротеида.

В некоторых примерах зависимой от сыворотки иммортализованной линией клеток млекопитающего является линия клеток яичника китайского хомячка. В некоторых вариантах зависимая от сыворотки иммортализованная линия клеток млекопитающего эндогенно не экспрессирует дигидрофолатредуктазу. В некоторых вариантах отобранный субклон со стадии (f) растет в суспензии. В некоторых вариантах экспрессия рекомбинантного белка представляет собой экспрессию одного из двух: антитела и фермента (например, белка α -галактозидазы-А человека). Также предлагаются клетки млекопитающих, применимые для экспрессии рекомбинантного гликопротеида, получаемого любым из способов, предлагаемых в настоящем изобретении.

Также предлагаются способы получения рекомбинантного гликопротеида, которые включают в себя: получение клетки млекопитающего, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида, получаемого любым из способов, предлагаемых в настоящем изобретении; введение в клетку экспрессирующего вектора, содержащего последовательность, кодирующую гликопротеид; культивирование клетки в содержащей сыворотки ростовой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования

гликопротеида; и сбор гликопротеида из клетки или ростовой культуральной среды. В некоторых примерах культивирование осуществляют, используя суспензионную культуру клеток. В некоторых вариантах культивирование осуществляют, используя биореактор. В некоторых вариантах культивирование осуществляют, используя не содержащую белка, не содержащую сыворотки, химически определенную среду (например, культивирование клетки яичника китайского хомячка (СНО) с использованием не содержащей белка, не содержащей сыворотки, химически определенной среды). В некоторых вариантах клетка СНО эндогенно не экспрессирует дигидрофолатредуктазу. В некоторых вариантах рекомбинантный гликопротеид является ферментом (например, белком α -галактозидазы-А человека). В некоторых вариантах последовательность, кодирующая гликопротеид, по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах экспрессирующий вектор дополнительно содержит: промоторную последовательность, оперативно связанную с 5'-концом последовательности, кодирующей гликопротеид; последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека со стартовым кодоном TTG, оперативно связанным с 5'-концом последовательности, кодирующей гликопротеид; и последовательность, кодирующую сайт узнавания поли(А), оперативно связанную с 3'-концом последовательности, кодирующей гликопротеид. В некоторых вариантах промоторная последовательность выбрана из группы, состоящей из промотора грS21 хомячка, промотора β -актина хомячка и раннего промотора SV40; и последовательность, кодирующая сайт узнавания поли(А), представляет собой раннюю последовательность узнавания поли(А) SV40. В некоторых вариантах экспрессирующий вектор дополнительно содержит последовательность, кодирующую глутаминсинтетазу человека или собаки или дигидрофолатредуктазу. В некоторых вариантах 5'-конец последовательности, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки или дигидрофолатредуктазу, оперативно связан с ранним промотором SV40, и 3'-конец последовательности, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки или дигидрофолатредуктазу, оперативно связан с ранним интроном SV40 и сигнальной последовательностью поли(А). В некоторых примерах гликопротеид собирают из клетки. В некоторых примерах гликопротеид собирают из культуральной среды для клеток. Также предлагаются рекомбинантные гликопротеиды (например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека), полученные любым из способов, предлагаемых в настоящем изобретении. Также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантный гликопротеид, полученный любым из способов, предлагаемых в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Например, фармацевтическая композиция может быть приготовлена для внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интрадермального, подкожного или внутрибрюшинного введения. В некоторых вариантах гликопротеид представляет собой рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, и фармацевтическая композиция содержит концентрацию примерно от 4 мг/мл до примерно 6 мг/мл (например, примерно 5 мг/мл) рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция представляет собой стерильный лиофилизированный порошок.

Также предлагаются способы лечения болезни Фабри у субъекта, которые включают в себя введение субъекту, имеющему болезнь Фабри, терапевтически эффективного количества любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека (rhAGA), предлагаемых в настоящем изобретении. В некоторых вариантах введение является системным введением (например, внутривенным введением). В некоторых вариантах субъекту вводят rhAGA в дозе примерно от 0,5 мг/кг массы тела до примерно 2,0 мг/кг массы тела (например, примерно 1,0 мг/кг массы тела). В некоторых вариантах субъекту вводят две или более доз белка rhAGA. Например, по меньшей мере две или более доз белка rhAGA можно вводить примерно с интервалом в две недели. Некоторые варианты дополнительно включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, выбранных из группы: анальгетиков, антикоагулянтов, ингибиторов ацетилхолинэстеразы, β -блокаторов и ингибиторов гликозилцерамидсинтазы. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах у субъекта диагностировано наличие болезни Фабри.

Также предлагаются способы повышения уровня белка α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего, которые включают в себя осуществление контакта клетки млекопитающего с эффективным количеством любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека (rhAGA), предлагаемых в настоящем изобретении. В некоторых вариантах клетка находится в условиях *in vitro* (например, клетка человека *in vitro*). В некоторых вариантах клетка находится в организме субъекта (например, человека). В некоторых вариантах у субъекта было диагностировано наличие болезни Фабри. В некоторых примерах контактирование осуществляют посредством системного введения rhAGA субъекту. Например, системное введение может быть внутривенным введением. В некоторых вариантах субъекту вводят rhAGA в дозе, составляющей примерно от 0,5 мг/кг массы тела до примерно 2,0 мг/кг массы тела (например, примерно 1,0 мг/кг массы тела). В некоторых вариантах субъекту вводят две или более доз белка rhAGA. Например, можно вводить по меньшей мере две из двух или более доз белка rhAGA с интервалом примерно в две недели.

Также предлагаются способы снижения уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта, которые включают в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком введении, терапевтически эффектив-

ного количества любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека (rhAGA), предлагаемых в настоящем изобретении. В некоторых вариантах субъект имеет уровень глоботриаолцерамида более 8 мкг/мл. В некоторых примерах у субъекта было диагностировано наличие болезни Фабри. В некоторых вариантах введение является системным введением (например, внутривенным введением). В некоторых вариантах субъекту вводят rhAGA в дозе, составляющей примерно от 0,5 мг/кг массы тела до примерно 2,0 мг/кг массы тела (например, примерно 1,0 мг/кг массы тела). В некоторых вариантах субъекту можно вводить две или более доз белка rhAGA. Например, можно вводить по меньшей мере две из двух или более доз белка rhAGA с интервалом примерно в две недели. Некоторые варианты дополнительно включают в себя введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, выбранных из группы: анальгетиков, антикоагулянтов, ингибиторов ацетилхолинэстеразы, β -блокаторов и ингибиторов гликозилцерамидсинтазы. В некоторых вариантах субъектом является человек.

Под термином "изолированная" подразумевают молекулу, которая отделена от по меньшей мере одного контаминанта (например, белка, нуклеиновой кислоты, липида или углевода или их сочетания). В не ограничивающих примерах изолированный белок α -галактозидазы-А или другой гликопротеин очищен по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 мас.%. Термин "жидкая культуральная среда" означает жидкость, которая содержит питательные вещества, достаточные для обеспечения роста или пролиферации клетки млекопитающего *in vitro*. Например, жидкая культуральной среды может содержать одно или несколько из следующих веществ: аминокислоты (например, 20 аминокислот), пурин (например, гипоксантин), пиримидин (например, тимидин), холин, инозит, тиамин, фолиевую кислоту, биотин, кальций, ниацинамид, пиридоксин, рибофлавин, тимидин, цианокобаламин, пируват, липоевую кислоту, магний, глюкозу, натрий, калий, железо, медь, цинк и бикарбонат натрия. В некоторых вариантах жидкая культуральная среда может содержать сыворотку млекопитающего. В некоторых вариантах жидкая культуральная среда не содержит сыворотку или другой экстракт из организма млекопитающего (определенная жидкая культуральная среда). В некоторых вариантах жидкая культуральной среды может содержать следы металлов, гормон роста млекопитающего и/или фактор роста млекопитающего. Другим примером жидкой культуральной среды является минимальная среда (например, среда, которая содержит только неорганические соли, источник углерода и воду). Не ограничивающие примеры жидкой культуральной среды описаны в настоящей публикации. Дополнительные примеры жидкой культуральной среды известны в данной области и коммерчески доступны. Жидкая культуральная среда может содержать клетки млекопитающих с любой плотностью. Например, в используемом в настоящем изобретении случае объем жидкой культуральной среды, извлекаемой из биореактора, по существу может не содержать клеток млекопитающих.

Термин "не содержащая сыворотки жидкая культуральная среда" означает жидкую культуральную среду, которая не содержит сыворотки млекопитающего.

Термин "содержащая сыворотку жидкая культуральная среда" означает жидкую культуральную среду, которая содержит сыворотку млекопитающего.

Термин "химически определенная жидкая культуральная среда" является термином, употребляемым в данной области, и означает жидкую культуральную среду, в которой известны все химические компоненты. Например, химически определенная жидкая культуральная среда не содержит фетальной сыворотки теленка, бычьего сывороточного альбумина или сывороточного альбумина человека, так как такие препараты обычно содержат сложную смесь альбуминов и липидов.

Термин "не содержащая белка жидкая культуральная среда" означает жидкую культуральную среду, которая не содержит никакого белка (например, никакого регистрируемого белка).

Термин "интегрированный способ" означает способ, осуществляемый с использованием структурных элементов, которые функционируют совместно для достижения конкретного результата (например, создания терапевтического белкового лекарственного вещества (например, который содержит рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) из жидкой культуральной среды).

Термин "непрерывный способ" означает способ, при котором непрерывно подают жидкость через, по меньшей мере, часть системы для получения лекарственного вещества (например, лекарственного вещества, содержащего рекомбинантный белок) из культуральной среды, содержащей рекомбинантный белок (например, любой из рекомбинантных белков, описанных в настоящей публикации). Например, жидкую культуральную среду, которая содержит рекомбинантный терапевтический белок (например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) непрерывно подают в систему, которая при этом работает, и лекарственное вещество в виде терапевтического белка выводят из системы. Не ограничивающие примеры таких систем, которые можно применять для осуществления непрерывного способа, описаны в предварительных заявках на выдачу патента США № 61/856930 и 61/775060.

Термин "состоящая из нескольких колонок хроматографическая система" или "MCCS" означает систему, состоящую из двух или более взаимно соединенных или переключающихся хроматографических колонок и/или хроматографических мембран. Одним из примеров состоящей из нескольких колонок хроматографической системы является периодическая противоточная хроматографическая система (PCC), которая содержит две или более взаимно соединенных или переключающихся хроматографиче-

ских колонок и/или хроматографических мембран. Дополнительные примеры состоящих из нескольких колонок хроматографических систем известны в данной области.

Термин "секретируемый белок" или "секретируемый рекомбинантный белок" хорошо известен в данной области и означает белок (например, рекомбинантный белок), который секретируется, по меньшей мере частично, из клетки млекопитающего, по меньшей мере, во внеклеточное пространство (например, выходит в жидкую культуральную среду). Специалистам будет понятно, что "секретируемый" белок не обязательно должен полностью отделиться от клетки, чтобы его можно было считать секретруемым белком.

Термин "перфузионное культивирование" означает культивирование множества клеток (например, клеток млекопитающих) в первой жидкой культуральной среде, при этом культивирование включает в себя периодическое или непрерывное извлечение первой жидкой культуральной среды и одновременно или сразу после этого добавление по существу такого же объема второй жидкой культуральной среды в емкость (например, биореактор). В некоторых примерах происходит пошаговое изменение (например, увеличение или уменьшение) объема первой жидкой культуральной среды, извлекаемой и добавляемой через определенные периоды каждого шага (например, примерно 24-часовой период, период, составляющие примерно от 1 мин до примерно 24 ч, или период, составляющие более 24 ч) во время периода культивирования (например, норма новой подачи культуральной среды на ежедневной основе). Часть среды, удаляемой и заменяемой каждый день, может варьировать, в зависимости от конкретных культивируемых клеток, начальной плотности посева и плотности клеток в конкретный момент времени. "RV" или "объем реактора" означает объем культуральной среды, имеющейся в начале процесса культивирования (например, общий объем культуральной среды, имеющийся при посеве). Биореакторы, которые можно использовать для осуществления перфузионного культивирования, известны в данной области. Специалистам будет понятно, что биореактор может быть приспособлен для применения с целью перфузионного культивирования (например, приспособлен в качестве перфузионного биореактора).

Термин "культивирование с периодической подпиткой" является термином, используемым в данной области, и означает культивирование множества клеток (например, клеток млекопитающих) в первой жидкой культуральной среде, при этом культивирование клеток, имеющихся в емкости (например, в биореакторе), включает в себя периодическое или непрерывное добавление второй жидкой культуральной среды к первой жидкой культуральной среде по существу без удаления или без значительного удаления первой жидкой культуральной среды или второй жидкой культуральной среды из культуры клеток. Вторая жидкая культуральная среда может быть такой же, как первая жидкая культуральная среда. В некоторых примерах культуры с периодической подпиткой вторая жидкая культуральная среда представляет собой концентрированную форму первой жидкой культуральной среды. В некоторых примерах культуры с периодической подпиткой вторую жидкую культуральную среду добавляют в виде сухого порошка. Специалистам будет понятно, что биореактор может быть приспособлен для применения при культивировании с периодической подпиткой (например, приспособлен в качестве биореактора с периодической подпиткой).

"Показатель удельной продуктивности" или "SPR" является термином, применяемым в данной области, и в используемом в настоящем описании смысле относится к массе или ферментативной активности рекомбинантного терапевтического белка, продуцируемого на клетку млекопитающего в сутки. SPR в случае рекомбинантного терапевтического антитела обычно измеряют в виде масса/клетку/сутки. SPR в случае рекомбинантного терапевтического фермента обычно измеряют в единицах/клетку/сутки или в виде (единицы/масса)/клетку/сутки.

"Показатель объемной продуктивности" или "VPR" является термином, применяемым в данной области, и в используемом в настоящем описании смысле относится к массе или ферментативной активности рекомбинантного терапевтического белка, продуцируемого в определенном объеме культуры (например, на литр объема биореактора, сосуда или пробирки) в сутки. VPR в случае рекомбинантного терапевтического антитела обычно измеряют в виде массы/л/сутки. VPR в случае рекомбинантного терапевтического фермента обычно измеряют в единицах/л/сутки или в виде массы/л/сутки.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области, к которой настоящее изобретение относится. Способы и материалы описаны в настоящей публикации для применения в настоящем изобретении; также можно применять другие подходящие способы и материалы, известные в данной области. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты, последовательности, доступы в базы данных и другие ссылки, упоминаемые в настоящем описании, включены в виде ссылки в полном объеме. В случае конфликта, настоящее описание, включая определения, будет проведено.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления изобретения указаны на сопровождающих чертежах и в описании ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут понятны из описания и чертежей и из формулы изобретения.

Описание чертежей

На фиг. 1 представлен список лизосомных болезней накопления и соответствующий дефект фермента для каждой болезни.

На фиг. 2 представлена последовательность кДНК, кодирующая белок-предшественник α -галактозидазы-А человека, и аминокислотная последовательность белка-предшественника α -галактозидазы-А человека (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно), и аминокислотная последовательность зрелого белка α -галактозидазы-А человека (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 3 представлена карта вектора pGZ629-2GFZ, который включает в себя последовательность кДНК, кодирующую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека (2GFZ).

На фиг. 4 представлена карта вектора, который можно применять для экспрессии рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека.

На фиг. 5 представлена блок-схема, показывающая стадии, используемые для создания родительской клеточной линии, оптимизированной для экспрессии рекомбинантного гликопротеида.

На фиг. 6 представлена хроматограмма, показывающая элюирование Fabrazyme® и Replagal® с колонки для эксклюзионной хроматографии по размеру.

На фиг. 7А показан профиль времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активируемой лазерной десорбцией/ионизацией, основанной на определении отношения массы к заряду (МАЛДИ-ВП-МС) для Fabrazyme®.

На фиг. 7В показан профиль масс-спектрометрии МАЛДИ-ВП-МС для Replagal®.

На фиг. 8 представлен набор из трех профилей МАЛДИ-ВП-масс-спектрометрии, основанной на определении отношения массы к заряду, для Fabrazyme® (вверху) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G) (в середине и внизу).

Фиг. 9 представляет собой картину полиакриламидного геля с додецилсульфатом натрия для Fabrazyme® и Replagal®.

На фиг. 10 представлен примерный профиль хроматографического элюирования N-связанных олигосахаридов, дериватизованных 2-антраниловой кислотой (АА-меченых), показывающий структуры N-связанного олигосахарида(ов), соответствующие каждому пику. На вставке показаны две трехантенные, трисиалилированные олигосахаридные структуры, при этом одна из двух структур соответствует пику б (форма 1), а другая из двух структур соответствует пику б' (форма 2) на профиле хроматографического элюирования N-связанных олигосахаридов, дериватизованных 2-АА.

На фиг. 11 показан профиль хроматографического элюирования АА-меченых N-связанных олигосахаридов из Fabrazyme® (синий) и Replagal® (красный).

На фиг. 12 представлен график, показывающий процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды (пик 1), моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (пик 2), моносиалилированные олигосахариды (пик 3), бисиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (пик 4), бисиалилированные олигосахариды (пик 5), трехантенные трисиалилированные олигосахариды (форма 1; пик 6), трехантенные трисиалилированные олигосахариды (форма 2; пик 6'), манноза-6-фосфат-олигосахариды (пик 7), монофосфорилированные олигосахариды (пик 8), тетрасиалилированные олигосахариды (пик 9), моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды (пик 10) и бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (пик 11) (слева направо) в Fabrazyme® (левый столбик в каждой группе из двух столбиков) и Replagal® (правый столбик в каждой группе из двух столбиков).

На фиг. 13 представлен график, показывающий распределение N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn108 в Fabrazyme® и Replagal®, которое определено с использованием ЖХ/МС-анализа каждого ферментативно расщепленного белка.

На фиг. 14 представлен график, показывающий распределение N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn161 в Fabrazyme® и Replagal®, которое определено с использованием ЖХ/МС-анализа каждого ферментативно расщепленного белка.

На фиг. 15 представлен график, показывающий распределение N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn184 в Fabrazyme® и Replagal®, которое определено с использованием ЖХ/МС-анализа каждого ферментативно расщепленного белка.

На фиг. 16 представлен график, показывающий распределение N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn108 в Fabrazyme® и FZ2G, которое определено с использованием ЖХ/МС-анализа каждого ферментативно расщепленного белка.

На фиг. 17 представлен пример графика, показывающего структуру N-связанных олигосахаридов, присутствующих в каждом пике после ЖХ/МС-анализа N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn108 в Fabrazyme® и FZ2G.

На фиг. 18 представлен график, показывающий распределение N-связанных олигосахаридов, присутствующих у аминокислотного остатка Asn161 в Fabrazyme® и FZ2G, которое определено с использованием структуры каждого ферментативно расщепленного белка.

На фиг. 24С представлен график, показывающий процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (пик 11), в Fabrazyme® (FZ) и в рекомбинантном белке α -галактозидазы-А человека, предлагаемом в настоящем изобретении (FZ2G), которое определено в результате хроматографического анализа АА-меченых N-связанных олигосахаридов.

Фиг. 25А представляет собой график, показывающий соотношение моль/моль манноза-6-фосфат к белку (вверху) Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантному белку α -галактозидазы-А человека, предлагаемому в настоящем изобретении (FZ2G).

Фиг. 25В представляет собой график, показывающий соотношение моль/моль N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA) к белку Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантному белку α -галактозидазы-А человека, предлагаемому в настоящем изобретении (FZ2G).

Фиг. 26 представляет собой график, показывающий данные независимого от растворимых катионов связывания рецептора манноза-6-фосфата, полученные с использованием резонанса поверхностного плазмона (Biacore), для Fabrazyme® (FZ) (красный) и Replagal® (зеленый).

Фиг. 27 представляет собой график, показывающий данные независимого от растворимых катионов связывания рецептора манноза-6-фосфата, полученные с использованием резонанса поверхностного плазмона (Biacore), для Fabrazyme® (FZ) (красный) и Replagal® (зеленый).

Фиг. 28 представлен график, показывающий относительное независимое от растворимых катионов связывание рецептора манноза-6-фосфата белком Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантным белком α -галактозидазы-А человека, предлагаемым в настоящем изобретении, (FZ2G), которое определено с использованием резонанса поверхностного плазмона (Biacore).

На фиг. 29 представлен график, показывающий относительное процентное содержание Fabrazyme® (FZ) и Replagal®, элюированных с аффинной колонки с рецептором манноза-6-фосфата возрастающими концентрациями манноза-6-фосфата.

На фиг. 30 представлен график, показывающий относительное процентное содержание Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), элюированных с аффинной колонки с рецептором манноза-6-фосфата возрастающими концентрациями манноза-6-фосфата.

На фиг. 31 представлен профиль пиков, полученных при капиллярном изоэлектрическом фокусировании с визуализацией (icIEF), для Fabrazyme® и Replagal®.

Фиг. 32А представляет собой график, показывающий процент Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), присутствующих в пиках 1-5 icIEF.

Фиг. 32В представляет собой график, показывающий процент Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), присутствующих в пиках 6-11 icIEF.

Фиг. 32С представляет собой график, показывающий процент Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), присутствующих в пиках 12-14 icIEF.

Фиг. 33 представляет собой график K_m Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), определенного с использованием синтетического субстрата pNP.

Фиг. 34 представляет собой график V_{max} Fabrazyme® (FZ) и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), определенной с использованием синтетического субстрата pNP.

На фиг. 35 представлен профиль элюирования Fabrazyme® (blue) и Replagal® (зеленый) с колонки для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

На фиг. 36 представлен график, показывающий количество GL3 в ткани печени (нг GL3/мг ткани печени) в мышинной модели Фабри через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 0,1 мг/кг Fabrazyme®, или через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 0,1 мг/кг рекомбинантного белка α -галактозидазы А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), или в мышинной модели Фабри после внутривенного введения одной доз наполнителя. Один образец был исключен из анализа, так как было посчитано, что он является выбросом согласно критерию Граббса ($p < 0,01$) (группа, указанная знаком "а" на графике).

На фиг. 37 представлен график, показывающий количество GL3 в ткани селезенки (нг GL3/мг ткани селезенки) в мышинной модели Фабри через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 0,1 мг/кг Fabrazyme® или через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 0,1 мг/кг рекомбинантного белка α -галактозидазы А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), или в мышинной модели Фабри после внутривенного введения одной дозы наполнителя.

На фиг. 38 представлен график, показывающий количество GL3 в ткани сердца (нг GL3/мг ткани

сердца) в мышинной модели Фабри через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 1,0 мг/кг Fabrazyme® или через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 1,0 мг/кг рекомбинантного белка α -галактозидазы А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), или в мышинной модели Фабри после внутривенного введения одной дозы наполнителя.

На фиг. 39 представлен график, показывающий количество GL3 в ткани почек (нг GL3/мг ткани почек) в мышинной модели Фабри через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 1,0 мг/кг Fabrazyme® или через 3 дня или 14 дней после однократного внутривенного введения 1,0 мг/кг рекомбинантного белка α -галактозидазы А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), или в мышинной модели Фабри после внутривенного введения одной дозы наполнителя.

На фиг. 40 представлен график, показывающий ферментативную активность с течением времени в мышинной модели Фабри после однократного внутривенного введения 1 мг/кг Fabrazyme® (кружки; 5 мышей в каждой временной точке) или 1 мг/кг рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (квадраты; 8 мышей в каждой временной точке).

Подробное описание

В настоящем изобретении предлагается рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, имеющий измененный профиль гликозилирования по сравнению с Fabrazyme®, и композиции, фармацевтические композиции и наборы, содержащие по меньшей мере один из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека. Предлагаемые в настоящем изобретении рекомбинантные гликопротеиды и композиции, содержащие предлагаемые в настоящем изобретении рекомбинантные гликопротеиды, обладают, например, следующими преимуществами: меньшей вариабельностью гликоформ и/или более низким риском или уровнем контаминации (например, более низким риском или уровнем вирусной контаминации). Предлагаемые в настоящем изобретении рекомбинантные гликопротеиды также могут иметь одно или несколько из следующих не ограничивающих преимуществ: пониженное неспецифичное целенаправленное действие на печень (посредством связывания с рецептором асиалогликопротеида, экспрессированным на поверхности гепатоцитов, после введения рекомбинантного гликопротеида субъекту, например, человеку), повышенную скорость эндоцитоза рекомбинантного гликопротеида клеткой млекопитающего (например, клеткой человека), экспрессирующей белок рецептора манноза-6-фосфата на поверхности, повышенную аффинность к белку рецептора манноза-6-фосфата, увеличенное время полужизни в сыворотке и более низкую эффективную дозу в любом сочетании по сравнению с Fabrazyme®. Также предлагаются способы создания клетки млекопитающего, применимой для рекомбинантной экспрессии рекомбинантного гликопротеида (например, белка α -галактозидазы-А человека), и способы получения рекомбинантного гликопротеида (например, белка α -галактозидазы-А человека). Также предлагаются способы лечения болезни Фабри, способы снижения уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта и способы повышения уровня α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего (например, клетке *in vitro* или клетке в организме субъекта). Также предлагаются экспрессирующие векторы, которые содержат последовательность, кодирующую белок α -галактозидазы-А человека.

Альфа-галактозидаза-А

Человеческая α -галактозидаза-А (α -D-галактозидгалактогидролаза; α -gal A; EC 3.2.1.22) является лизосомной экзогликозидазой, кодируемой геном на Xq22. Зрелая α -галактозидаза-А человека представляет собой гомодимер, состоящий из двух нековалентно связанных субъединиц из 398 аминокислот (примерно 51 кД), каждая из которых содержит активный участок и три возможных участка N-связанного гликозилирования (N139, N192, и N215). Активный участок белка α -галактозидазы-А имеет два остатка аспарагиновой кислоты (D170 и D231), которые важны для каталитической активности. Трехмерная кристаллическая структура белка α -галактозидазы-А опубликована в 1996 году (Munier-Lehmann et al., J. Biol. Chem. 271: 15166-15174, 1996). Альфа-галактозидаза-А катализирует гидролиз глоботриаозилцерамида (GL-3) и других нейтральных гликосфинголипидов, содержащих на конце α -галактил, таких как галабиозилцерамид и вещества крови группы В, до дигексозида церамида и галактозы. Удельную активность рекомбинантной формы α -галактозидазы-А можно тестировать, используя синтетический субстрат, например, п-нитрофенил- α -D-галактопиранозид (pNP).

Гликозилирование белка α -галактозидазы-А человека позволяет ему направляться к мишени, лизосоме, в клетках человека. Краткий обзор клеточных путей, используемых для гликозилирования белка α -галактозидазы-А человека и других гликопротеидов человека приведен ниже.

Белок α -галактозидазы-А человека синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме. После синтеза каждый мономер белка α -галактозидазы-А человека подвергается посттрансляционной модификации в аппарате Гольджи. Как указано выше, каждый мономер белка α -галактозидазы-А человека имеет три возможных участка N-гликозилирования (N139, N192, и N215). Существует несколько физиологических гликоформ белка α -галактозидазы-А человека. Остаток N139 связывает сложные углеводы, тогда как остатки N192 и N215 связывают олигосахариды, богатые маннозой, и поэтому вовлечены в направление фермента к мишени для захвата лизосомой. После синтеза в эндоплазматическом ретикулуме предшественники лизосомных ферментов переносятся в аппарат Гольджи. Посттрансляционные модификации, и в

частности, добавление остатков маннозы-6-фосфата (М6Р), происходит в цис-Гольджи. Комплекс М6Р-фермент связывается с рецептором М6Р и высвобождается из сети транс-Гольджи, откуда он и транспортируется в прелизосомные/эндосомные компартменты. Когда он оказывается в эндосомном компартменте, кислое значение pH вызывает диссоциацию фермента из комплекса с его рецептором.

Затем он подвергается дефосфорилированию с получением зрелого и функционального фермента. Затем рецептор вновь возвращается и используется в транс-Гольджи, набирая другие ферменты, или движется к плазматической мембране, где может подобрать эндогенный фермент (Sly et al., *J. Cell Biochem.* 18: 67-85, 1982; Helenius et al., *Ann. Rev. Biochem.* 32: 1-100, 1997).

Биосинтез всех эукариотических N-гликанов начинается на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) с переносом GlcNAc-P от UDP-GlcNAc к липидоподобному предшественнику долихолфосфату (Dol-P) с образованием долихолпирофосфат-N-ацетилглюкозамина (Dol-P-P-GlcNAc). К Dol-P последовательно добавляются четырнадцать Сахаров с образованием гликана Glc3Man9GlcNAc2 перед переносом полного гликана на аспарагин в последовательности Asn-X-Ser/Thr в белке в ЭР протеинолигосахарилтрансферазой. Связанный с белком N-гликан затем ремоделируется в ЭР и аппарате Гольджи в результате сложно серии реакций, катализируемых связанными с мембраной гликозидазами и гликозилтрансферазами. После ковалентного связывания состоящего из 14 сахаров олигоманнозагликана с Asn-X-Ser/Thr, используется серия реакций для обрезки трех сахаров из Glc3Man9GlcNAc2 в ЭР. Такие стадии обрезки являются консервативными среди всех эукариот. Обрезка Glc3Man9GlcNAc2 начинается с последовательного удаления остатков глюкозы α -гликозидазами I и II. Обе гликозидазы функционируют в просвете ЭР, при этом α -гликозидаза I действует на концевой α 1-2Glc, а α -гликозидаза II последовательно удаляет два внутренних остатка α 1-3Glc. Перед выходом из ЭР на многие гликопротеиды действует α -маннозидаза I ЭР, которая специфично удаляет концевой α 1-2Man из центрального плеча Man9GlcNAc2 с образованием изомера Man8GlcNAc2. Большинство гликопротеидов, выходящих из ЭР на пути к аппарату Гольджи, содержат N-гликаны с восьмью или девятью остатками маннозы (в зависимости от того, подвергались ли они воздействию α -маннозидазой I ЭР). В случае большинства гликопротеидов дополнительные остатки маннозы удаляются в цис-компартменте аппарата Гольджи вплоть до образования Man5GlcNAc2.

Биосинтез гибридных и сложных N-гликанов иницируется в средней части аппарата Гольджи в результате действия N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, называемой GlcNAcT-1. GlcNAcT-1 добавляет остаток N-ацетилглюкозамина к C-2 маннозы α 1-3 в сердцевине Man5GlcNAc2, который иницирует первую ветвь N-гликана. После осуществления указанной стадии большинство N-гликанов обрезается α -маннозидазой II, которая удаляет концевые остатки α 1-3Man и α 1-6Man из GlcNAcMan5GlcNAc2 с образованием GlcNAcMan3GlcNAc2. После удаления двух остатков маннозы добавляется второй N-ацетилглюкозамин к C-2 маннозы α 1-6 под действием GlcNAcT-II с образованием предшественника всех двухантенных сложных N-гликанов. Полученный в результате гликан имеет две антенны или ветви, которые иницируются добавлением концевых остатков N-ацетилглюкозамина. Дополнительные ветви могут быть иницированы у C-4 сердцевинной маннозы α 1-3 (под действием GlcNAcT-IV) и у C-6 сердцевинной маннозы α 1-6 (под действием GlcNAcT-V) с образованием трех- и четырехантенных N-гликанов. Другой фермент, называемый GlyNAcT-IX или GlcNAcT-Vb, катализирует такую же реакцию, как и GlcNAcT-V у C-6 сердцевинной маннозы α 1-6, но в отличие от GlcNAcT-V, GlcNAcT-IX/Vb также может переносить N-ацетилглюкозамин на C-6 сердцевинной маннозы α 1-3. Другая ветвь может быть иницирована у C-4 коровой маннозы α 1-3 под действием GlcNAcT-VI.

Сложные и гибридные N-гликаны могут нести разветвляющийся остаток N-ацетилглюкозамина, который связан с β -маннозой сердцевинны в результате действия GlcNAcT-III. Двух-, трех- и четырехантенные сложные N-гликаны с разветвляющимся N-ацетилглюкозамином синтезируются в том случае, когда GlcNAcT-III действует после α -маннозидазы II и инициации ветвей под действием GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV и GlcNAcT-V.

Добавления дополнительных сахаров, главным образом происходящие в транс-части аппарата Гольджи, превращают гибридные и разветвленные N-гликаны в расширенную матрицу зрелых сложных N-гликанов. Сахара могут быть добавлены к сердцевине, разветвляющиеся остатки N-ацетилглюкозамина могут удлиняться добавлением сахаров и удлиненные ветви могут быть экпированы или декорированы. Например, продуктом GlcNAcT-II является двухантенный N-гликан, который может быть удлинен добавлением фукозы, галактозы и сиаловой кислоты с образованием сложного N-гликана с двумя ветвями. Сложные N-гликаны могут, например, иметь много дополнительных сахаров, включая сахара, связанные с сердцевинной N-гликана, дополнительные ветви, ветви, удлиненные единицами поли-N-ацетиллактозамина и разные экпирующие структуры. Олигосахариды сложного типа синтезируются в аппарате Гольджи из содержащих маннозу-3 олигосахаридов, например, в результате добавления остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты.

Модификация сердцевинны часто представляет собой добавление фукозы в области связи α 1-6 к N-ацетилглюкозамину вблизи с аспарагином в сердцевине гликана. Фукозилтрансферазы, вовлеченные в перенос фукозы к такому сердцевинному N-ацетилглюкозамину, требуют предшествующего действия

GlcNAcT-1. Большинство сложных и гибридных N-гликанов имеют удлиненные ветви, которые образуются в результате добавления β -связанного остатка галактозы к подвергающемуся инициации N-ацетилглюкозамину с образованием широко распространенного строительного блока Gal β 1-4GlcNAc, называемого N-ацетиллактозаминотипа 2. Антенны могут быть дополнительно удлинены последовательным добавлением остатков N-ацетилглюкозамина и галактозы с получением в результате tandemных повторов LacNAc (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-)n, называемого поли-N-ацетиллактозаминотипа. В другом примере β -связанная галактоза добавляется к C-3 N-ацетилглюкозамина с образованием Gal β 1-3GlcNAc, называемого последовательностью N-ацетиллактозаминотипа 1. В некоторых белках β -связанный N-ацетилгалактозамин добавляется к N-ацетилглюкозамину вместо β -связанной галактозы с образованием антенны с удлинением GalNAcP1-4GlcNAc.

Реакции кэпирования или декорирования заключаются в добавлении к ветвям сиаловой кислоты, фукозы, галактозы, N-ацетилгалактозамина и сульфата. Кэпирующие сахара обычно α -связаны и поэтому отходят от β -связанных лентообразных ветвей поли-N-ацетиллактозамина.

Лизосомные ферменты могут требовать GlcNAc-1-P у C-6 остатков маннозы на олигоманноза-N-гликанах в цис-части аппарата Гольджи. Затем N-ацетилглюкозамин удаляется в транс-части аппарата Гольджи гликозидазой, при этом раскрывая остатки Man-6-P, которые узнаются рецептором Man-6-P и отправляются в кислый прелизосомный компартмент.

Олигосахариды гибридного типа синтезируются в Гольджи из сердцевинных структур маннозы-3 и маннозы-5 добавлением, например, остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Гибридные N-гликаны образуются, если на гликан GlcNAcMan5GlcNAc2 не действует α -маннозидаза II, оставляя периферические остатки α 1-3Man и α 1-6Man интактными и не модифицированными в зрелом гликопротеиде. Неполное действие α -маннозидазы II может приводить к образованию гибридов GlcNAcMan4GlcNAc2. Другая маннозидаза аппарата Гольджи, α -маннозидаза IIX, также действует на GlcNAcMan5GlcNAc2, образованный за счет GlcNAcT-1.

Подробный обзор путей биосинтеза и ферментов, используемых для образования N-связанных гликанов (например, типа олигосахаридов с высоким содержанием маннозы) приведен в публикации Stanley et al., "N-Glycans" в *Essentials of Glycobiology*, Ed. Varki, Cummings, and Eskho, Cold Spring Harbor Press, 2009. Как указано выше, посттрансляционное гликозилирование рекомбинантной α -галактозидазы-A человека важно для правильного транспорта белка. Например, замена остатка серина в положении аминокислоты 215 приводит к нарушению транспорта фермента в лизосому (Munier-Lehmann et al., *J. Biol. Chem.* 271:15166-15174, 1996; Wildt et al., *Nat. Rev. Microbiol.* 3:119-128, 2005). Исследование, описывающее разные гликоформы белка α -галактозидазы-A человека, экспрессированного в клетке CHO, описано в публикации Matsuura et al., *Glycobiology* 8: 329-339, 1998.

Примеры последовательностей предшественника и зрелого белка α -галактозидазы-A человека показаны на фиг. 2, соответственно (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно). Рекомбинантный белок α -галактозидазы человека, который описан в настоящей публикации, может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична (например, по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Рекомбинантный белок α -галактозидазы-A человека может иметь (например, может состоять из) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична (например, по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. В других примерах рекомбинантный белок α -галактозидазы-A человека может содержать последовательность SEQ ID NO: 2 с 1-30 аминокислотами (например, 1-25 аминокислотами, 1-20 аминокислотами, 1-15 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-5 аминокислотами, 1-3 аминокислотами, 1 или 2 аминокислотами, 20-25 аминокислотами, 15-25 аминокислотами, 10-25 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-8 аминокислотами и 5-15 аминокислотами), удаленными с N-конца и/или 1-30 аминокислотами, удаленными с C-конца (например, 1-25 аминокислотами, 1-20 аминокислотами, 1-15 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-5 аминокислотами, 1-3 аминокислотами, 1 или 2 аминокислотами, 20-25 аминокислотами, 15-25 аминокислотами, 10-25 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-8 аминокислотами и 5-15 аминокислотами).

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-A человека может быть ковалентно связан с гетерологичной аминокислотной последовательностью или меткой. Не ограничивающие примеры гетерологичной аминокислотной последовательности, которые могут быть связаны с рекомбинантным белком α -галактозидазы человека, включают: поли-His-метку, связывающий хитин белок, связывающий мальтозу белок, глутатион-S-трансферазу и стрептавидин. Метка любого типа может быть ковалентно связана с белком α -галактозидазы-A человека (например, флуоресцирующая группа, радионуклеид и флуоресцирующий белок). Дополнительные примеры молекул, которые могут быть ковалентно связаны с белком α -галактозидазы-A человека, включают полимер, например, полиэтиленгликоль, поливинил, сложный полиэфир, полилактид, полигликолид, поликапролактон и их сополимеры.

Примеры последовательностей предшественника и зрелого белка α -галактозидазы-A человека показаны на фиг. 2 соответственно (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно). Рекомбинантный белок α -

галактозидазы человека, который описан в настоящей публикации, может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична (например, по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека может иметь (например, может состоять из) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична (например, по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. В других примерах рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека может содержать последовательность SEQ ID NO: 2 с 1-30 аминокислотами (например, 1-25 аминокислотами, 1-20 аминокислотами, 1-15 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-5 аминокислотами, 1-3 аминокислотами, 1 или 2 аминокислотами, 20-25 аминокислотами, 15-25 аминокислотами, 10-25 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-8 аминокислотами и 5-15 аминокислотами), удаленными с N-конца и/или 1-30 аминокислотами, удаленными с С-конца (например, 1-25 аминокислотами, 1-20 аминокислотами, 1-15 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-5 аминокислотами, 1-3 аминокислотами, 1 или 2 аминокислотами, 20-25 аминокислотами, 15-25 аминокислотами, 10-25 аминокислотами, 1-10 аминокислотами, 1-8 аминокислотами и 5-15 аминокислотами).

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека может быть ковалентно связан с гетерологичной аминокислотной последовательностью или меткой. Не ограничивающие примеры гетерологичной аминокислотной последовательности, которые могут быть связаны с рекомбинантным белком α -галактозидазы человека, включают поли-His-метку, связывающий хитин белок, связывающий мальтозу белок, глутатион-S-трансферазу и стрептавидин. Метка любого типа может быть ковалентно связана с белком α -галактозидазы-А человека (например, флуоресцирующая группа, радионуклеид и флуоресцирующий белок). Дополнительные примеры молекул, которые могут быть ковалентно связаны с белком α -галактозидазы-А человека, включают полимер, например, полиэтиленгликоль, поливинил, сложный полиэфир, полилактид, полиглицолид, поликапролактон и их сополимеры.

Пример нуклеиновой кислоты (например, кДНК), кодирующей белок α -галактозидазы-А человека, показан на фиг. 2 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых примерах любая из нуклеиновых кислот (например, кДНК), описанных в настоящей публикации, может быть ковалентно связана с одной или несколькими из флуоресцирующих меток и гасителей. В других примерах любая из нуклеиновых кислот (например, кДНК) может содержать или дополнительно содержать по меньшей мере один нуклеотид, который содержит радиоактивный изотоп (например, P^{32} , P^{33} и/или S^{35}).

Измененные гликоформы белка α -галактозидазы-А

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам α -галактозидазы-А человека (FZ2G), которые имеют измененное (например, улучшенное) гликозилирование по сравнению с Fabrazyme®. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют, например, повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (по сравнению с Fabrazyme®), что приводит к повышенному связыванию с рецептором манноза-6-фосфата, что в свою очередь может увеличивать скорость эндоцитоза рекомбинантного белка клеткой млекопитающего (например, клеткой человека), экспрессирующей белок рецептора манноза-6-фосфата на своей поверхности (по сравнению с Fabrazyme®). Рекомбинантные белки α -галактозидазы А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, также могут иметь одно или оба из следующих свойств: пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами, и повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиалилированные олигосахариды, по сравнению с Fabrazyme®, что может приводить к снижению неспецифического направления рекомбинантного белка к мишени - печени (за счет связывания с рецептором асиалогликопротеида, экспрессированного на поверхности гепатоцитов, после введения рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека субъекту, например, человеку) и повышенное время полужизни в сыворотке, соответственно, по сравнению с Fabrazyme®.

Рекомбинантный белок α -галактозидазы А человека, предлагаемый в настоящем изобретении, также, например, проявляет меньшую вариабельность по составу (например, меньшую вариабельность гликоформ) и/или является более безопасным продуктом (например, с пониженным риском или уровнем контаминации одним или несколькими из следующих агентов: бактериофагами, бактериями, микобактериями и вирусами (например, энтеровирусами (например, энтеровирусами человека или животных), риновирусами (например, риновирусами животных или человека), пикобирнавирусами животных или человека, кобувирусами, вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, вирусом вирусной диареи крупного рогатого скота, бычьим реовирусом-3, Caliciviridae, эховирусом, вирусами полиомиелита, ротавирусами (например, ротавирусом животного или человека), спумавирусами крупного рогатого скота, эндогенным ретровирусом свиней, вирусом бычьего иммунодефицита, вирусами гепатита, везивирусами (например, везивирусом 2117), норовирусами (например, норовирусами животных или человека), астровирусами (например, астровирусами человека или животных), вирусом парагриппа жи-

вотных или человека или метапневмовирусами, анелловвирусами, коронавирусами, флебовирусами, вирус Шмалленберга крупного рогатого скота, калицивирусом, цикловирусами, цирковирусами (например, цирковирусом свиней или коров), косавирусами, вирусом Коксаки, вирусом Куба, пестивирусом, вирусами полиомиелита (например, вирусом бычьего полиомиелита), вирусом бычьей папилломы, новым вирусом папилломы грызунов типа 2, SV40, парвовирусами (например, парвовирусом свиней, грызунов, человека или коров), кардиовирусами (например, EMCV), парамиксовирусами, вирусом везикулярного стоматита, гировирусами, косавирусом, вирусом долины Сенека, коронавирусом, вирусом инфекционной анемии лошадей, аеновирусом человека, калицивирусом кошачьих, аеновирусом типа 2, бычьим аденовирусом типа 3, вирусом псевдобешенства, вирусом вирусной диареи крупного рогатого скота, вирусом парагриппа типа 3, вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, вирусом синего языка овец, вирусом лейкоза кошек, мелким вирусом мышей, парвовирусом крупного рогатого скота, вирусом долины Кэш, реовирусом (например, реовирусом животных или человека), аденовирусом собак, вирусом SV-40, вирусом энцефаломиокардита, PRRSV свиней, вирусом герпеса 4 крупного рогатого скота или вирусом болезни ног и рта)).

Ранее было показано, что Fabrazyme® имеет картину гликозилирования, значительно отличающуюся от Replagal® (Lee et al., Glycobiology 13: 305-313, 2003). Полагают, что заметные различия в картине гликозилирования Fabrazyme® и Replagal®, отчасти, являются следствием использования разных клеточных линий для получения таких белков (например, Fabrazyme® продуцируется линией клеток CHO, а Replagal® продуцируется линией клеток человека).

Fabrazyme® представляет собой рекомбинантную форму белка α -галактозидазы-А человека, получаемую и продаваемую Genzyme. Fabrazyme® и способы получения Fabrazyme® описаны, например, в патенте США № 5356804. Replagal® является рекомбинантной формой белка α -галактозидазы-А человека, получаемой и продаваемой Shire. Replagal® и способы получения Replagal® описаны, например, в патенте США № 6083725, 6458574, 6395884 и 7133354.

Рекомбинантные белки α -галактозидазы человека, предлагаемые в настоящем изобретении, (FZ2G) имеют два или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) структурных признака (например, в любом сочетании) (i)-(xii), перечисленных ниже. Любой из диапазонов значений, перечисленных ниже для каждого одного или несколько параметров (i)-(xii), может иметь место в рекомбинантном белке α -галактозидазы-А человека, предлагаемом в настоящем изобретении. Кроме того, любой из рекомбинантных белков α -галактозидазы человека, предлагаемых в настоящем изобретении, может иметь один или несколько (например, один, два или три) из приведенных в качестве примера функциональных свойств, описанных в настоящем разделе. Любое сочетание физических характеристик и/или функциональных свойств рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации, можно сочетать любым образом. Примеры сочетаний структурных признаков рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, предлагаемых в настоящем изобретении, описаны ниже.

Кроме того, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G) может иметь меньшую вариабельность структуры (например, меньшую вариабельность гликоформ) и/или пониженный риск или уровень контаминации (например, пониженный риск или уровень контаминации).

Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может не иметь регистрируемой уровня или не содержать белка, липида, углевода, нуклеиновой кислоты и контаминанта (например, любого из контаминантов, описанных в настоящей публикации), присутствующих в животном продукте (например, сыворотке животного, плазме животного или продукте, полученном из крови животного). Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, продуцированный в культуре клеток, в которой используют только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки, и химически определенной среды. Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, продуцированный в культуре клеток, в которой используют только не содержащую белка и/или химически определенную среду. Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, продуцированный в культуре клеток, в которой используют только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной среды, и выделенный с использованием интегрированного и непрерывного способа (например, любого из интегрированных и непрерывных способов, описанных в настоящей публикации или в WO 14/137903). Любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении, может представлять собой белок rhAGA, имеющий улучшенный профиль безопасности (например, пониженный риск контаминации (например, любым из приведенных в качестве примера контаминантов, описанных в настоящей публикации или известных в данной области), по сравнению с белком rhAGA, предлагаемым в настоящем изобретении, который получен способом, который включает в себя применение культуральной среды, содержащей животный продукт (например, сыворотку животного, плазму животного или фактор или белок крови животного).

Биофизические свойства

I. N-связанные моносиалилированные олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, описанные в настоящей публикации, могут иметь пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами, по сравнению с Fabrazyme®. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, описанные в настоящей публикации, могут иметь примерно такое же или немного пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, по сравнению с Fabrazyme®. Такой признак является преимуществом, так как моносиалилированные олигосахариды могут содержать открытые незащищенные остатки галактозы, которые связываются с рецептором асиалогликопротеидов, экспрессированным на гепатоцитах в печени. Печень не является органом-мишенью для рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, и поэтому считают, что уменьшение количества моносиалилированных олигосахаридов снижает непродуктивный таргетинг такого фермента в организме человека.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами (например, пик 3 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 1,7 до примерно 3,2%. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении (FZ2G), могут иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами (например, пик 3 в профилях меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) примерно от 0,1 до примерно 1,6% (например, примерно от 0,1 до примерно 1,5%, примерно от 0,1 до примерно 1,4%, примерно от 0,1 до примерно 1,3%, примерно от 0,1 до примерно 1,2%, примерно от 0,1 до примерно 1,1%, примерно от 0,1 до примерно 1,0%, примерно от 0,1 до примерно 0,9%, примерно от 0,1 до примерно 0,8%, примерно от 0,1 до примерно 0,7%, примерно от 0,1 до примерно 0,6%, примерно от 0,1 до примерно 0,5%, примерно от 0,1 до примерно 0,4%, примерно от 0,2 до примерно 1,4%, примерно от 0,2 до примерно 1,3%, примерно от 0,2 до примерно 1,2%, примерно от 0,2 до примерно 1,0%, примерно от 0,2 до примерно 0,9%, примерно от 0,2 до примерно 0,8%, примерно от 0,2 до примерно 0,7%, примерно от 0,3 до примерно 1,4%, примерно от 0,3 до примерно 1,3%, примерно от 0,3 до примерно 1,3%, примерно от 0,3 до примерно 1,2%, примерно от 0,3 до примерно 1,2%, примерно от 0,3 до примерно 1,1%, примерно от 0,3 до примерно 1,0%, примерно от 0,3 до примерно 0,9%, примерно от 0,3 до примерно 0,8%, примерно от 0,3 до примерно 0,7%, примерно от 0,4 до примерно 1,4%, примерно от 0,4 до примерно 1,3%, примерно от 0,4 до примерно 1,2%, примерно от 0,4 до примерно 1,1%, примерно от 0,4 до примерно 1,0%, примерно от 0,4 до примерно 0,9%, примерно от 0,4 до примерно 0,8%, примерно от 0,4 до примерно 0,7%, примерно от 0,5 до примерно 1,4%, примерно от 0,5 до примерно 1,3%, примерно от 0,5 до примерно 1,2%, примерно от 0,5 до примерно 1,1%, примерно от 0,5 до примерно 1,0%, примерно от 0,5 до примерно 0,9%, или примерно от 0,6 до примерно 1,2%).

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 2 в профилях меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) примерно от 2,0 до примерно 5,7%.

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении (FZ2G), могут иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 2 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) примерно от 0,1 до 3,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 2,9%, примерно от 0,1 до примерно 2,8%, примерно от 0,1 до примерно 2,7%, примерно от 0,1 до примерно 2,6%, примерно от 0,1 до примерно 2,5%, примерно от 0,1 до примерно 2,4%, примерно от 0,1 до примерно 2,3%, примерно от 0,1 до примерно 2,2%, примерно от 0,1 до примерно 2,1%, примерно от 0,1 до примерно 2,0%, примерно от 0,1 до примерно 1,9%, примерно от 0,1 до примерно 1,8%, примерно от 0,1 до примерно 1,7%, примерно от 0,1 до примерно 1,6%, примерно от 0,1 до примерно 1,5%, примерно от 0,1 до примерно 1,4%, примерно от 0,1 до примерно 1,3%, примерно от 0,1 до примерно 1,2%, примерно от 0,3 до примерно 3,0%, примерно от 0,3 до примерно 2,9%, примерно от 0,3 до примерно 2,8%, примерно от 0,3 до примерно 2,7%, примерно от 0,3 до примерно 2,6%, примерно от 0,3 до примерно 2,5%, примерно от 0,3 до примерно 2,4%, примерно от 0,3 до примерно 2,3%, примерно от 0,3 до примерно 2,2%, примерно от 0,3 до примерно 2,1%, примерно от 0,3 до примерно 2,0, примерно от 0,3 до примерно 1,9%, примерно от 0,3 до примерно 1,8%, примерно от 0,3 до примерно 1,7%, примерно от 0,3 до примерно 1,6%, примерно от 0,3 до примерно 1,5%, примерно от 0,3 до примерно 1,4%, примерно от 0,3 до примерно 1,3%, или примерно от 0,3 до примерно 1,2%).

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами или моносиалилированными содержащими фукозу олигосахаридами, описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

II. N-связанные бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) по сравнению с Fabrazyme®. Повышенный уровень бис-манноза-6-фосфат-олигосахаридов приводит к повышенному таргетингу к клеткам, которые экспрессируют рецептор манноза-6-фосфата на своей плазматической мембране. Связывание с рецептором манноза-6-фосфата запускает эндоцитоз фермента в клетку и челночное движение фермента в лизосому клетки.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профилях меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) примерно от 4,0 до примерно 7,0%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 7,5% (например, больше чем примерно 7,6%, больше чем примерно 7,7%, больше чем примерно 7,8%, больше чем примерно 7,9%, больше чем примерно 8,0%, больше чем примерно 8,1%, больше чем примерно 8,2%, больше чем примерно 8,2%, больше чем примерно 8,3%, больше чем примерно 8,4%, больше чем примерно 8,5%, больше чем примерно 8,6%, больше чем примерно 8,7%, больше чем примерно 8,8%, больше чем примерно 8,9%, больше чем примерно 8,9%, больше чем примерно 9,0%, больше чем примерно 9,1%, больше чем примерно 9,2%, больше чем примерно 9,3%, больше чем примерно 9,4%, больше чем примерно 9,5%, больше чем примерно 9,6%, больше чем примерно 9,7%, больше чем примерно 9,8%, больше чем примерно 9,9%, больше чем примерно 10,0%, больше чем примерно 10,1%, больше чем примерно 10,2%, больше чем примерно 10,3%, больше чем примерно 10,4%, больше чем примерно 10,5%, больше чем примерно 10,6%, больше чем примерно 10,7%, больше чем примерно 10,8%, больше чем примерно 10,9% или больше чем примерно 11%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 7,0 до примерно 13%, примерно от 8,0 до примерно 12,0% или примерно от 9,0 до примерно 11,0%.

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды, описаны в примерах.

Дополнительные способы известны в данной области.

III. N-связанные бисалилированные и N-связанные бисалилированные содержащие фукозу олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь примерно такое же или повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®. Предлагаемые рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека могут иметь пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные олигосахариды (например, пик 5 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®. Полагают, что повышенный уровень бисалилированных содержащих фукозу олигосахаридов повышает время полужизни белка *in vivo* и/или *in vitro* (например, в сыворотке субъекта или в фармацевтической композиции).

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) примерно от 11,0 до примерно 14,2%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 13,0% (например, больше чем примерно 13,1%, больше чем примерно 13,2%, больше чем примерно 13,3%, больше чем примерно 13,4%, больше чем примерно 13,5%, больше чем примерно 13,6%, больше чем примерно 13,7%, больше чем примерно 13,8%, больше чем примерно 13,9%, больше чем примерно 14,0%, больше чем примерно 14,1%, больше чем примерно 14,2%, больше чем примерно 14,3%, больше чем примерно 14,4%, больше чем примерно 14,5%, больше чем примерно 14,6%, больше чем примерно 14,7%, больше чем примерно 14,8%, больше чем примерно 14,9% или больше чем 15,0%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых ан-

траниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 13,0 до примерно 15,0%, примерно от 13,5 до примерно 15,5%, примерно от 14,0 до примерно 16,0% или примерно от 14,5 до примерно 16,5%.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисаилилированные олигосахариды (например, пик 5 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 5,6 до примерно 7,1%. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисаилилированные олигосахариды (например, пик 5 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,1 до примерно 5,3% (например, примерно от 0,1 до примерно 5,2%, примерно от 0,1 до примерно 5,1%, примерно от 0,1 до примерно 5,0%, примерно от 0,1 до примерно 4,9%, примерно от 0,1 до примерно 4,8%, примерно от 0,1 до примерно 4,7%, примерно от 0,1 до примерно 4,6%, примерно от 0,1 до примерно 4,5%, примерно от 0,1 до примерно 4,4%, примерно от 0,1 до примерно 4,3%, примерно от 0,1 до примерно 4,2%, примерно от 0,1 до примерно 4,1%, примерно от 0,1 до примерно 4,0%, примерно от 0,1 до примерно 3,9%, примерно от 0,1 до примерно 3,8%, примерно от 0,1 до примерно 3,7%, примерно от 0,1 до примерно 3,6%, примерно от 0,1 до примерно 3,5%, примерно от 0,1 до примерно 3,4%, примерно от 0,1 до примерно 3,3%, примерно от 0,1 до примерно 3,2%, примерно от 0,1 до примерно 3,1%, примерно от 0,1 до примерно 3,0%, примерно от 0,1 до примерно 2,9%, примерно от 0,1 до примерно 2,8%, примерно от 0,1 до примерно 2,7%, примерно от 0,1 до примерно 2,6%, примерно от 0,1 до примерно 2,5%, примерно от 0,3 до примерно 5,2%, примерно от 0,3 до примерно 5,1%, примерно от 0,3 до примерно 5,0%, примерно от 0,3 до примерно 4,9%, примерно от 0,3 до примерно 4,8%, примерно от 0,3 до примерно 4,7%, примерно от 0,3 до примерно 4,6%, примерно от 0,3 до примерно 4,5%, примерно от 0,3 до примерно 4,4%, примерно от 0,3 до примерно 4,3%, примерно от 0,3 до примерно 4,2%, примерно от 0,3 до примерно 4,1%, примерно от 0,3 до примерно 4,0%, примерно от 0,3 до примерно 3,9%, примерно от 0,3 до примерно 3,8%, примерно от 0,3 до примерно 3,7%, примерно от 0,3 до примерно 3,6%, примерно от 0,3 до примерно 3,5%, примерно от 0,3 до примерно 3,5%, примерно от 0,3 до примерно 3,4%, примерно от 0,3 до примерно 3,3%, примерно от 0,3 до примерно 3,2%, примерно от 0,3 до примерно 3,1%, примерно от 0,3 до примерно 3,0%, примерно от 0,3 до примерно 2,9%, примерно от 0,3 до примерно 2,8%, примерно от 0,3 до примерно 2,7%, примерно от 0,3 до примерно 2,6% или примерно от 0,3 до примерно 2,5%).

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисаилилированные и бисаилилированные содержащие фукозу олигосахариды, описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

IV. N-связанные трисаилилированные олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисаилилированные олигосахариды формы 2 (т.е. пик 6' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисаилилированные олигосахариды формы 1 (например, пик 6 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®. Вставка на фиг. 10 показывает две структуры трехантенных трисаилилированных олигосахаридов, при этом одна из двух структур соответствует пику 6 (форма 1), а другая из двух структур соответствует пику 6' (форма 2) в профиле хроматографического элюирования N-связанных олигосахаридов, дериватизованных 2-АА. Полагают, что повышенный уровень трисаилилированных содержащих фукозу олигосахаридов повышает время полужизни белка *in vivo* и/или *in vitro* (например, в сыворотке субъекта или в фармацевтической композиции).

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные трисаилилированные олигосахариды формы 2 (например, пик 6' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,5 до примерно 1,2%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные трисаилилированные олигосахариды формы 2 (например, пик 6' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет больше чем 2,0% (например, больше чем 2,1%, больше чем 2,2%, больше чем 2,3%, больше чем 2,4%, больше чем 2,5%, больше чем 2,6%, больше чем 2,7%, больше чем 2,8%, больше чем 2,9%, больше чем 3,0%, больше чем 3,1%, больше чем 3,2%, больше чем 3,3%, больше чем 3,4%, больше чем 3,5%, больше чем 3,6%, больше чем 3,7%, больше чем 3,8%, больше чем 3,9%, больше чем 4,0%, больше чем 4,1%, больше чем 4,2%, больше чем 4,3%, больше чем 4,4%, больше чем 4,5%, больше чем 4,6%, больше чем 4,7%, больше чем 4,8%, больше чем 4,9%, больше чем 5,0%, больше чем 5,1%, больше чем 5,2%, больше чем 5,3%, больше чем 5,4%, больше чем 5,5%, больше чем 5,6%, больше чем 5,7%, больше чем 5,8%, больше чем

5,9%, больше чем 6,0%, больше чем 6,1%, больше чем 6,2%, больше чем 6,3%, больше чем 6,4%, больше чем 6,5%, больше чем 6,7%, больше чем 6,8%, больше чем 6,9%, больше чем 7,0% или больше чем 7,1%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисиалилированные олигосахариды формы 2 (например, пик б' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 5,0 до примерно 9,0%, примерно от 5,5 до примерно 8,5%, примерно от 6,0 до примерно 8,0% или примерно от 6,5 до примерно 7,5%.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисиалилированные олигосахариды формы 1 (например, пик б в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 9,5 до примерно 13%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные трисиалилированные олигосахариды формы 1 (например, пик б в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 0,1 до примерно 9,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 8,9%, примерно от 0,1 до примерно 8,8%, примерно от 0,1 до примерно 8,7%, примерно от 0,1 до примерно 8,6%, примерно от 0,1 до примерно 8,5%, примерно от 0,1 до примерно 8,4%, примерно от 0,1 до примерно 8,3%, примерно от 0,1 до примерно 8,2%, примерно от 0,1 до примерно 8,1%, примерно от 0,1 до примерно 8,0%, примерно от 0,1 до примерно 7,9%, примерно от 0,1 до примерно 7,8%, примерно от 0,1 до примерно 7,7%, примерно от 0,1 до примерно 7,6%, примерно от 0,1 до примерно 7,5%, примерно от 0,1 до примерно 7,4%, примерно от 0,1 до примерно 7,3%, примерно от 0,1 до примерно 7,2%, примерно от 0,1 до примерно 7,1%, примерно от 0,1 до примерно 7,0%, примерно от 0,1 до примерно 6,9%, примерно от 0,1 до примерно 6,8%, примерно от 0,1 до примерно 6,7%, примерно от 0,1 до примерно 6,6%, примерно от 0,1 до примерно 6,5%, примерно от 0,1 до примерно 6,4%, примерно от 0,1 до примерно 6,3%, примерно от 0,1 до примерно 6,2%, примерно от 0,1 до примерно 6,1%, примерно от 0,1 до примерно 6,0%, примерно от 0,1 до примерно 5,9%, примерно от 0,1 до примерно 5,8%, примерно от 0,1 до примерно 5,7%, примерно от 0,1 до примерно 5,6%, примерно от 0,1 до примерно 5,5%, примерно от 0,1 до примерно 5,4%, примерно от 0,1 до примерно 5,3%, примерно от 0,1 до примерно 5,2%, примерно от 0,1 до примерно 5,1%, примерно от 0,1 до примерно 5,0%, примерно от 0,1 до примерно 4,9%, примерно от 0,1 до примерно 4,8%, примерно от 0,1 до примерно 4,7%, примерно от 0,1 до примерно 4,6%, примерно от 0,1 до примерно 4,5%, примерно от 0,1 до примерно 4,4%, примерно от 0,1 до примерно 4,3%, примерно от 0,1 до примерно 4,2%, примерно от 0,1 до примерно 4,1%, примерно от 0,1 до примерно 4,0%, примерно от 0,1 до примерно 3,9%, примерно от 0,1 до примерно 3,8%, примерно от 0,1 до примерно 3,7%, примерно от 0,1 до примерно 3,6%, примерно от 0,1 до примерно 3,5%, примерно от 0,1 до примерно 3,4%, примерно от 0,1 до примерно 3,3%, примерно от 0,1 до примерно 3,2%, примерно от 0,1 до примерно 3,1% или примерно от 0,1 до примерно 3,0%).

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды, описаны в примерах.

Дополнительные способы известны в данной области.

V. Соотношение моль/моль сиаловая кислота/белок

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь соотношение моль/моль сиаловой кислоты к белку, которое является примерно таким же или больше, чем у Fabrazyme®. Повышенное количество молекул сиаловой кислоты, присутствующих в олигосахаридах, как полагают, увеличивает время полужизни белка *in vitro* и/или *in vivo* (например, в фармацевтической композиции и в сыворотке млекопитающего).

Fabrazyme® имеет соотношение моль/моль сиаловой кислоты к белку, составляющее примерно от 2,6 до примерно 3,3. Fabrazyme® также имеет соотношение моль/моль сиаловой кислоты к манноза-6-фосфату, которое больше чем 1,5. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь соотношение моль/моль сиаловой кислоты к белку, которое больше чем 3,0 (например, больше чем 3,1, больше чем 3,2, больше чем 3,3, больше чем 3,4, больше чем 3,5, больше чем 3,6, больше чем 3,7, больше чем 3,8, больше чем 3,9, больше чем 4,0, больше чем 4,1, больше чем 4,2, больше чем 4,3, больше чем 4,4, больше чем 4,5, больше чем 4,6, больше чем 4,7, больше чем 4,8, больше чем 4,9 или больше чем 5,0).

Примеры способов определения соотношения моль/моль сиаловой кислоты к белку описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

VI. N-связанные нейтрально заряженные олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь пониженное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды (например, пик 1 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®.

VIII. N-связанные монофосфорилированные олигосахариды

Предлагаемые рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека могут иметь повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды, по сравнению с Fabrazyme®.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой N-связанные монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 10,9 до примерно 14,7%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 14,8% (например, больше чем примерно 14,9%, больше чем примерно 15,0%, больше чем примерно 15,1%, больше чем примерно 15,2%, больше чем примерно 15,3%, больше чем примерно 15,4%, больше чем примерно 15,5%, больше чем примерно 15,6%, больше чем примерно 15,7%, больше чем примерно 15,8%, больше чем примерно 15,9%, больше чем примерно 16,0%, больше чем примерно 16,1%, больше чем примерно 16,2%, больше чем примерно 16,3%, больше чем примерно 16,4%, больше чем примерно 16,5%, больше чем примерно 16,6%, больше чем примерно 16,7%, больше чем примерно 16,8%, больше чем примерно 16,9%, больше чем примерно 17,0%, больше чем примерно 17,1%, больше чем примерно 17,2%, больше чем примерно 17,3%, больше чем примерно 17,4%, больше чем примерно 17,5%, больше чем примерно 17,6%, больше чем примерно 17,7%, больше чем примерно 17,8%, больше чем примерно 17,9%, больше чем примерно 18,0%, больше чем примерно 18,1%, больше чем примерно 18,2%, больше чем примерно 18,3%, больше чем примерно 18,4%, больше чем примерно 18,5%, больше чем примерно 18,6%, больше чем примерно 18,7%, больше чем примерно 18,8%, больше чем примерно 18,9%, больше чем примерно 19,0%, больше чем примерно 19,1%, больше чем примерно 19,2%, больше чем примерно 19,3%, больше чем примерно 19,4%, больше чем примерно 19,5%, больше чем примерно 19,6%, больше чем примерно 19,7%, больше чем примерно 19,8%, больше чем примерно 19,9%, больше чем примерно 20,0%, больше чем примерно 20,1%, больше чем примерно 20,2%, больше чем примерно 20,3%, больше чем примерно 20,4%, больше чем примерно 20,5%, больше чем примерно 20,6%, больше чем примерно 20,7%, больше чем примерно 20,8%, больше чем примерно 20,9%, больше чем примерно 21,0%, больше чем примерно 21,1%, больше чем примерно 21,2%, больше чем примерно 21,3%, больше чем примерно 21,4%, больше чем примерно 21,5%, больше чем примерно 21,6%, больше чем примерно 21,7%, больше чем примерно 21,8%, больше чем примерно 21,9%, больше чем примерно 22,0%, больше чем примерно 22,1%, больше чем примерно 22,2%, больше чем примерно 22,3%, больше чем примерно 22,4%, больше чем примерно 22,5%, больше чем примерно 22,6%, больше чем примерно 22,7%, больше чем примерно 22,8%, больше чем примерно 22,9% или больше чем примерно 23,0%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 15,5 до примерно 17,5%, примерно от 16,0 до примерно 18,0% или примерно от 16,5 до примерно 18,5%.

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

IX. N-связанные тетрасаилилированные олигосахариды

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасаилилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), по сравнению с Fabrazyme®. Повышенный уровень тетрасаилилированных олигосахаридов, как полагают, увеличивает время полужизни белка *in vivo* и/или *in vitro* (например, в сыворотке субъекта или в фармацевтической композиции).

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасаилилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 2,3 до примерно 4,8%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасаилилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 4,9% (например, больше чем примерно 5,0%, больше чем примерно 5,1%, больше чем примерно 5,2%, больше чем примерно 5,3%, больше чем примерно 5,4%, больше чем примерно 5,5%, больше чем примерно 5,6%, больше чем примерно 5,7%, больше чем примерно 5,8%, больше чем примерно 5,9%, больше чем примерно 6,0%, больше чем

примерно 6,1%, больше чем примерно 6,2%, больше чем примерно 6,3%, больше чем примерно 6,4%, больше чем примерно 6,5%, больше чем примерно 6,6%, больше чем примерно 6,7%, больше чем примерно 6,8%, больше чем примерно 6,9%, больше чем примерно 7,0%, больше чем примерно 7,1%, больше чем примерно 7,2%, больше чем примерно 7,3%, больше чем примерно 7,4%, больше чем примерно 7,5%, больше чем примерно 7,6%, больше чем примерно 7,7%, больше чем примерно 7,8%, больше чем примерно 7,9% или больше чем примерно 8,0%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасаилилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 6,0 до примерно 8,0%, примерно от 6,5 до примерно 8,5%, примерно от 6,0 до примерно 9,0% или примерно от 7,0 до примерно 9,0%.

Примеры способов осуществления и определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасаилилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

X. N-связанные гибридные структуры, которые являются моносиалилированными и монофосфорилированными

Предлагаемые рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека могут иметь повышенное процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные структуры, по сравнению с Fabrazyme®.

Fabrazyme® имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные олигосахариды (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 6,0 до примерно 8,1%. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь процентное содержание суммарных N-связанных гибридных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные олигосахариды (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 8,2% (например, больше чем примерно 8,3%, больше чем примерно 8,4%, больше чем примерно 8,5%, больше чем примерно 8,6%, больше чем примерно 8,7%, больше чем примерно 8,8%, больше чем примерно 8,9%, больше чем примерно 9,0%, больше чем примерно 9,1%, больше чем примерно 9,2%, больше чем примерно 9,3%, больше чем примерно 9,4%, больше чем примерно 9,5%, больше чем примерно 9,6%, больше чем примерно 9,7%, больше чем примерно 9,8%, больше чем примерно 9,9%, больше чем примерно 10,0%, больше чем примерно 10,1%, больше чем примерно 10,2%, больше чем примерно 10,3%, больше чем примерно 10,4%, больше чем примерно 10,5%, больше чем примерно 10,6%, больше чем примерно 10,7%, больше чем примерно 10,8%, больше чем примерно 10,9%, больше чем примерно 11,0%, больше чем примерно 11,1%, больше чем примерно 11,2%, больше чем примерно 11,3%, больше чем примерно 11,4% или больше чем примерно 11,5%). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь процентное содержание суммарных N-связанных гибридных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные олигосахариды (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 8,5% и 10,5%, примерно от 9,0 до примерно 11,0% или примерно от 8,5 до примерно 9,5%.

Примеры способов определения процентного содержания суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

XI. Изoeлектрическая точка

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, также имеют сдвинутую изоэлектрическую точку по сравнению с Fabrazyme®, при анализе с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (icIEF) (см. пример 3 и табл. 3).

Примеры способов определения изоэлектрической точки полипептида описаны в примерах. Дополнительные способы определения изоэлектрической точки полипептида (например, изоэлектрическое фокусирование в гелях) известны в данной области.

XII. Соотношение моль/моль манноза-6-фосфат/белок

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь соотношение моль/моль манноза-6-фосфата к белку, которое является примерно таким же или больше, чем у Fabrazyme®. Увеличенное соотношение моль/моль манноза-6-фосфата к белку, как полагают, увеличивает поглощение белка клетками, экспрессирующими рецептор манноза-6-фосфата в плазматической мембране.

Fabrazyme® имеет соотношение моль/моль манноза-6-фосфата к белку примерно от 1,7 до пример-

но 3,1. Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь соотношение моль/моль манноза-6-фосфата к белку, которое является по существу таким же, как у Fabrazyme®, или больше чем 1,7 (например, больше чем 1,8, больше чем 1,9, больше чем 2,0, больше чем 2,1, больше чем 2,2, больше чем 2,3, больше чем 2,4, больше чем 2,5, больше чем 2,6, больше чем 2,7, больше чем 2,8, больше чем 2,9, больше чем 3,0, больше чем 3,1, больше чем 3,2, больше чем 3,3, больше чем 3,4 или больше чем 3,5). Например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), может иметь соотношение моль/моль манноза-6-фосфата к белку, которое составляет примерно от 1,8 до примерно 3,5 (например, примерно от 1,8 до примерно 3,4, примерно от 1,8 до примерно 3,3, примерно от 1,8 до примерно 3,2, примерно от 1,8 до примерно 3,1, примерно от 1,8 до примерно 3,0, примерно от 1,8 до примерно 2,9, примерно от 1,8 до примерно 2,8, примерно от 1,8 до примерно 2,7, примерно от 1,8 до примерно 2,6, примерно от 1,8 до примерно 2,5, от 1,8 до примерно 2,4, примерно от 1,8 до примерно 2,3, примерно от 1,8 до примерно 2,2, примерно от 1,8 до примерно 2,1, примерно от 1,8 до примерно 2,0, примерно от 1,9 до примерно 3,5, примерно от 1,9 до примерно 3,4, примерно от 1,9 до примерно 3,3, примерно от 1,9 до примерно 3,2, примерно от 1,9 до примерно 3,1, примерно от 1,9 до примерно 3,0, примерно от 1,9 до примерно 2,9, примерно от 1,9 до примерно 2,8, примерно от 1,9 до примерно 2,7, примерно от 1,9 до примерно 2,6, примерно от 1,9 до примерно 2,5, примерно от 1,9 до примерно 2,5, примерно от 1,9 до примерно 2,4, примерно от 1,9 до примерно 2,3, примерно от 1,9 до примерно 2,2, примерно от 1,9 до примерно 2,1, примерно от 2,0 до примерно 3,5, примерно от 2,0 до примерно 3,4, примерно от 2,0 до примерно 3,3, примерно от 2,0 до примерно 3,2, примерно от 2,0 до примерно 3,1, примерно от 2,0 до примерно 3,0, примерно от 2,0 до примерно 2,9, примерно от 2,0 до примерно 2,8, примерно от 2,0 до примерно 2,7, примерно от 2,0 до примерно 2,6, примерно от 2,0 до примерно 2,5, примерно от 2,0 до примерно 2,4, примерно от 2,0 до примерно 2,3, примерно от 2,0 до примерно 2,2, примерно от 2,1 до примерно 3,5, примерно от 2,1 до примерно 3,4, примерно от 2,1 до примерно 3,3, примерно от 2,1 до примерно 3,2, примерно от 2,1 до примерно 3,1, примерно от 2,1 до примерно 3,0, примерно от 2,1 до примерно 2,9, примерно от 2,1 до примерно 2,8, примерно от 2,1 до примерно 2,7, примерно от 2,1 до примерно 2,6, примерно от 2,1 до примерно 2,5, примерно от 2,1 до примерно 2,4, примерно от 2,1 до примерно 2,3, примерно от 2,2 до примерно 3,5, примерно от 2,2 до примерно 3,4, примерно от 2,2 до примерно 3,3, примерно от 2,2 до примерно 3,2, примерно от 2,2 до примерно 3,1, примерно от 2,2 до примерно 3,0, примерно от 2,2 до примерно 2,9, примерно от 2,2 до примерно 2,8, примерно от 2,2 до примерно 2,7, примерно от 2,2 до примерно 2,6, примерно от 2,2 до примерно 2,5, примерно от 2,2 до примерно 2,4, примерно от 2,3 до примерно 3,5, примерно от 2,3 до примерно 3,4, примерно от 2,3 до примерно 3,3, примерно от 2,3 до примерно 3,2, примерно от 2,3 до примерно 3,1, примерно от 2,3 до примерно 3,0, примерно от 2,3 до примерно 2,9, примерно от 2,3 до примерно 2,8, примерно от 2,3 до примерно 2,7, примерно от 2,3 до примерно 2,6, примерно от 2,3 до примерно 2,5, примерно от 2,4 до примерно 3,5, примерно от 2,4 до примерно 2,9, примерно от 2,4 до примерно 2,8, примерно от 2,4 до примерно 2,7, примерно от 2,4 до примерно 2,6, примерно от 2,5 до примерно 3,5, примерно от 2,5 до примерно 3,4, примерно от 2,5 до примерно 3,3, примерно от 2,5 до примерно 3,2, примерно от 2,5 до примерно 3,1, примерно от 2,5 до примерно 3,0, примерно от 2,5 до примерно 2,9, примерно от 2,5 до примерно 2,8, примерно от 2,5 до примерно 2,7, примерно от 2,6 до примерно 3,5, примерно от 2,6 до примерно 3,4, примерно от 2,6 до примерно 3,3, примерно от 2,6 до примерно 3,2, примерно от 2,6 до примерно 3,1, примерно от 2,6 до примерно 3,0, примерно от 2,6 до примерно 2,9, примерно от 2,6 до примерно 2,8, примерно от 2,7 до примерно 3,5, примерно от 2,7 до примерно 3,4, примерно от 2,7 до примерно 3,3, примерно от 2,7 до примерно 3,2, примерно от 2,7 до примерно 3,1, примерно от 2,7 до примерно 3,0, примерно от 2,7 до примерно 2,9, примерно от 2,8 до примерно 3,5, примерно от 2,8 до примерно 3,4, примерно от 2,8 до примерно 3,3, примерно от 2,8 до примерно 3,2, примерно от 2,8 до примерно 3,1, примерно от 2,8 до примерно 3,0, примерно от 2,9 до примерно 3,5, примерно от 2,9 до примерно 3,4, примерно от 2,9 до примерно 3,3, примерно от 2,9 до примерно 3,2, примерно от 2,9 до примерно 3,1, примерно от 3,0 до примерно 3,5, примерно от 3,0 до примерно 3,4, примерно от 3,0 до примерно 3,3, примерно от 3,0 до примерно 3,2, примерно от 3,1 до примерно 3,5, примерно от 3,1 до примерно 3,4, примерно от 3,1 до примерно 3,3, примерно от 3,2 до примерно 3,5, примерно от 3,4 до примерно 3,4 или примерно от 3,3 до примерно 3,5).

Примеры способов определения соотношения моль/моль манноза-6-фосфата к белку описаны в примерах. Дополнительные способы известны в данной области.

Функциональные свойства

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь один или несколько (например, один, два или три) из следующих функциональных признаков: повышенный эндоцитоз (например, увеличенную скорость эндоцитоза) клеткой млекопитающего, экспрессирующей рецептор манноза-6-фосфата, пониженное связывание с рецептором асиалогликопротеида и повышенную аффинность к рецептору манноза-6-фосфата, каждый из признаков в сравнении с Fabrazyme®.

Способы определения эндоцитоза (например, скорости эндоцитоза) рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека в клетке млекопитающего, экспрессирующей манноза-6-фосфат, известны в данной области (например, Osborne et al., Curr. Protoc. Cell Biol., Chapter 11, Unit 1118, 2005). Не ограничивающие примеры клеток млекопитающих, экспрессирующих рецептор манноза-6-фосфата, включают фибробласты и эпителиальные клетки. Как известно в данной области, эндоцитоз рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека можно определить по снижению уровней белка в среде для культуры тканей (или сыворотке млекопитающего), повышению лизосомных или внутриклеточных уровней рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека в клетке млекопитающего, экспрессирующей рецептор манноза-6-фосфата, или опосредованно, например, в виде снижения накопления гликофинголипидов с концевыми остатками α -галактозила, таких как глоботриаозилцерамид (GL-3), в подвергаемой контакту клетке млекопитающего или в среде для культуры ткани (или сыворотке млекопитающего). Снижение уровней рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека в среде для культуры ткани (или сыворотке млекопитающего) можно определить, например, используя основанный на антителах анализ (например, твердофазный иммуноферментный анализ) или анализ активности (например, анализ активности с использованием rNP или 4MU в качестве субстратов). Примеры антител, которые связываются с рекомбинантным белком α -галактозидазы-А человека, доступны из Millipore, LifeSpan BioSciences, Inc., Thermo Scientific Pierce Antibodies, Acris Antibodies GmbH, и R & D Systems. Способы определения лизосомных или внутриклеточных уровней рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека могут включать, например, использование иммунофлуоресцентной микроскопии, пермеабилзации клеток и иммуноблоттинга и/или масс-спектрометрию клеточного или лизосомного лизата. Снижение накопления глоботриаозилцерамида (GL-3) можно определить, например, посредством выявления уровней GL-3 в среде для культуры тканей или в сыворотке млекопитающего с течением времени с использованием масс-спектрометрии (например, Kim et al., Korean J. Intern. Med. 25: 415-421, 2010) или основанного на антителах анализа (например, публикация заявки на выдачу патента США № 2012/0178105). В каждом случае эндоцитоз рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека можно сравнить с Fabrazyme®.

Способы определения способности белка (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека) связываться с рецептором асиалогликопротеида известны в данной области. Например, анализ для определения связывания рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека с рецептором асиалогликопротеида может включать стадию осуществления контакта клетки (например, гепатоцита), экспрессирующей асиалогликопротеид. Связывание рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека с рецептором асиалогликопротеида также можно определить, используя резонанс поверхностного плазмона (например, методика Biacore) (см., например, Stokmaier et al., Bioorg. Med. Chem. 17: 7254-7264, 2009) или поляризационного флуоресцентного анализа связывания рецептора асиалогликопротеида, описанного Kornilova с соавторами (Anal. Biochem. 425: 43-46, 2012). В любом случае связывание рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека с рецептором асиалогликопротеида можно сравнить с Fabrazyme®.

Способы определения связывания рекомбинантного белка α -галактозидазы-А с рецептором манноза-6-фосфата могут быть осуществлены с использованием анализов, которые включают стадию осуществления контакта рекомбинантного белка α -галактозидазы-А с клеткой (например, фибробластом или эндотелиальной клеткой), экспрессирующей рецептор манноза-6-фосфата. В других примерах связывание рекомбинантного белка α -галактозидазы-А с рецептором манноза-6-фосфата можно определить, используя резонанс поверхностного плазмона (например, методика Biacore) или способы аффинной хроматографии. Связывание рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека с рецептором манноза-6-фосфата можно сравнивать с Fabrazyme®.

Примеры рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами (например, пик 3 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,1 до примерно 1,6% (например, примерно от 0,1 до примерно 1,3% или примерно от 0,1 до примерно 1,0%) и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) больше чем примерно 7,5% (например, больше чем примерно 8,5%, больше чем примерно 9,0%, или больше чем примерно 9,5%). Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, кроме того, может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой биссиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), больше чем примерно 13,0% (например, больше чем примерно 13,5%, больше чем примерно 14,0%, больше чем примерно 14,5%, больше чем примерно 15,0%, больше чем примерно 15,5% или больше чем примерно 16,0%) и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисиалилированные олигосахариды формы 2 (например, пик 6' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов) больше чем примерно 2,0%

(например, больше чем примерно 2,5%, больше чем примерно 3,0%, больше чем примерно 3,5%, больше чем примерно 4,0%, больше чем примерно 4,5%, больше чем примерно 5,0%, больше чем примерно 5,5%, больше чем примерно 6,0%, больше чем примерно 6,5%, или больше чем примерно 7,0%).

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека может дополнительно иметь один или несколько (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять) из следующих физических признаков: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды (например, пик 1 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,1 до примерно 3,9% (например, примерно от 0,1 до примерно 3,5%, примерно от 0,1 до примерно 3,0%, примерно от 0,1 до примерно 2,5%, или примерно от 0,1 до примерно 2,0%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 2 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,1 до примерно 3,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 2,5%, или примерно от 0,1 до примерно 2,0%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисалилированные олигосахариды (например, пик 5 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), примерно от 0,1 до примерно 5,3% (например, примерно от 0,1 до примерно 5,0%, примерно от 0,1 до примерно 4,5%, примерно от 0,1 до примерно 4,0%, примерно от 0,1 до примерно 3,5%, примерно от 0,1 до примерно 3,0%, или примерно от 0,1 до примерно 2,5%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисиалилированные олигосахариды формы 1 (например, пик 6 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 0,1 до примерно 9,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 8,5%, примерно от 0,1 до примерно 8,0%, примерно от 0,1 до примерно 7,5%, примерно от 0,1 до примерно 7,0%, примерно от 0,1 до примерно 6,5%, примерно от 0,1 до примерно 6,0%, примерно от 0,1 до примерно 5,5%, примерно от 0,1 до примерно 5,0%, примерно от 0,1 до примерно 4,5%, примерно от 0,1 до примерно 4,0%, примерно от 0,1 до примерно 3,5%, примерно от 0,1 до примерно 3,0%, примерно от 0,1 до примерно 2,5%, или примерно от 0,1 до примерно 2,0%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 7 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет примерно от 0,1 до примерно 7,0% (например, примерно от 0,1 до примерно 6,5%, примерно от 0,1 до примерно 6,0%, примерно от 0,1 до примерно 5,5%, примерно от 0,1 до примерно 5,0%, примерно от 0,1 до примерно 4,5%, или примерно от 0,1 до примерно 4,0%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), больше чем примерно 14,8% (например, больше чем примерно 15,0%, больше чем примерно 15,5%, больше чем примерно 16,0%, больше чем примерно 16,5%, больше чем примерно 17,0%, больше чем примерно 17,5%, больше чем примерно 18,0%, больше чем примерно 18,5%, больше чем примерно 19,0%, больше чем примерно 19,5%, больше чем примерно 20,0%, больше чем примерно 20,5%, больше чем примерно 21,0%, больше чем примерно 21,5%, больше чем примерно 22,0%, больше чем примерно 22,5% или больше чем примерно 23,0%); процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиалилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 4,9% (например, больше чем примерно 5,0%, больше чем примерно 5,5%, больше чем примерно 6,0%, больше чем примерно 6,5%, больше чем примерно 7,0%, больше чем примерно 7,5% или больше чем примерно 8,0%); и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные олигосахариды (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое составляет более чем примерно 8,2% (например, больше чем примерно 8,5%, больше чем примерно 9,0%, больше чем примерно 9,5%, или больше чем примерно 10,0%).

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека также может иметь один или несколько из следующих функциональных признаков: повышенный эндоцитоз (например, повышенную скорость эндоцитоза) клеткой млекопитающего, экспрессирующей рецептор манноза-6-фосфата, пониженное связывание с рецептором асиалогликопротеида и повышенную аффинность к рецептору манноза-6-фосфата по сравнению с Fabrazyme®.

В других примерах рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека имеет процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами (например, пик 3 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое меньше чем у случае Fabrazyme®, и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 11 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое больше, чем в случае Fabrazyme®. Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека также может иметь процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные содержащие

фукозу олигосахариды (например, пик 4 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое является примерно таким же или больше, чем в случае Fabrazyme®, и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные трисиалилированные олигосахариды формы 2 (например, пик 6' в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое больше, чем в случае Fabrazyme®.

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека также может иметь один или несколько из следующих структурных признаков: процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды (например, пик 1 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (например, пик 2 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое является примерно таким же или меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бисиалилированные олигосахариды (например, пик 5 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трехантенные, трисиалилированные олигосахариды формы 1 (например, пик 6 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды (например, пик 7 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое является примерно таким же или меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (например, пик 8 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое больше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиалилированные олигосахариды (например, пик 9 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое больше, чем в случае Fabrazyme®; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, монофосфорилированные гибридные структуры (например, пик 10 в профиле меченых антраниловой кислотой N-связанных олигосахаридов), которое больше, чем Fabrazyme®. Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека также может иметь один или несколько из следующих признаков: повышенный эндоцитоз (например, повышенную скорость эндоцитоза) клеткой млекопитающего, экспрессирующей рецептор манноза-6-фосфата, пониженное связывание с рецептором асиалогликопротеида и повышенную аффинность к рецептору манноза-6-фосфата, каждый в сравнении с Fabrazyme®.

Экспрессирующие векторы

Также в настоящем изобретении предлагаются экспрессирующие векторы, содержащие последовательность (например, кДНК), кодирующую рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека согласно настоящему изобретению. Например, экспрессирующий вектор может содержать последовательность (например, кДНК), кодирующую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, которая по меньшей мере на 90% идентична (например, по меньшей мере на 90, 92, 94, 96, 98, 99 или 100% идентична) последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнение к указанной последовательности экспрессирующие векторы могут содержать промотор (и необязательно одну или несколько энхансерных последовательностей), оперативно связанный с 5'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека. Экспрессирующие векторы могут содержать последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека, со стартовым кодоном TTG, оперативно связанным с 5'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок, и последовательность, кодирующую сайт узнавания поли(А), оперативно связанную с 3'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок. Экспрессирующие векторы могут содержать последовательность (например, кДНК), кодирующую селективный маркер млекопитающего (например, белок синтазы человека или собаки), и промоторную последовательность, оперативно связанную с 5'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей селективируемый маркер млекопитающего, и необязательно последовательность раннего интрона SV40 и поли(А)-сигнальную последовательность, которые обе оперативно связаны с 3'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей селективируемый ген млекопитающего. Экспрессирующие векторы могут содержать один или несколько (например, два или три) из следующих компонентов: последовательность прокариотического промотора, которая оперативно связана с 5'-концом последовательности, кодирующей селективируемый ген прокариот (например, ген резистентности к ампициллину), прокариотическую последовательность начала репликации и эукариотическую последовательность начала репликации.

Не ограничивающие примеры промоторных последовательностей (и необязательно одной или нескольких энхансерных последовательностей), которые могут быть оперативно связаны с последовательностью (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, включают ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор рибосомного белка 21 (rpS21), промотор β -актина

хомячка, промотор цитомегаловируса (CMV) (например, немедленный ранний промотор CMV (см., например, Teschendorf et al., *Anticancer Res.* 22:3325-3330, 2002), промотор убиквитина C (UBC), промотор фактора элонгации 1- α (EF1A), промотор фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PCK), область промотора/энхансера IE2 из CMV мыши (см., например, Chatellard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 96: 106-117, 2007), и промотор β -актина кур. Дополнительные не ограничивающие примеры промоторов генов человека, которые можно использовать в любых экспрессирующих векторах, описанных в настоящей публикации, описаны в базе данных промоторов млекопитающих (веб-сайт Wistar Institute, mrpombdb.wistar.upenn.edu). Дополнительные примеры промоторных последовательностей млекопитающих, которые можно использовать в экспрессирующих векторах, известны в данной области. Одним из не ограничивающих примеров промотора и энхансера, который можно использовать в экспрессирующей плазмиде, является промотор β -актина кур с энхансером CMV (известный в данной области как промотор CAGG). Экспрессирующие векторы, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать последовательность промотора gpS21, промотора β -актина хомячка или раннего промотора SV40, оперативно связанную с 5'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека, со стартовым кодоном TTG, оперативно связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека (например, любой из нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, описанный в настоящей публикации), и последовательность, содержащую сайт узнавания поли(А), оперативно связанную с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека.

Не ограничивающими примерами последовательностей сайта узнавания поли(А) являются сайт узнавания поли(А) бычьего гормона роста. Структурные признаки сайта узнавания поли(А) человека описаны в публикации Nunes с соавторами (*EMBO J.* 29: 1523-1536, 2010). Дополнительные сайты узнавания поли(А) хорошо известны в данной области.

В некоторых примерах экспрессирующий вектор содержит промотор β -актина хомячка и последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека, со стартовым кодоном TTG, которые оперативно связаны с 5'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, и ранний интрон SV40 и последовательность узнавания поли(А), оперативно связанные с 3'-концом последовательности (например, кДНК), кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека.

Некоторые экспрессирующие векторы могут содержать последовательность, кодирующую селективируемый ген млекопитающего. Не ограничивающие примеры селективируемых генов млекопитающих включают ген дигидрофолатредуктазы, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к неомицину, гены резистентности к бластицидину, гены резистентности к зеоцину, гены глютаминсинтетазы, гены резистентности к дигидрофолату и гены гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы. Примеры последовательностей, кодирующих такие селективируемые гены млекопитающих, известны в данной области. 5'-Конец последовательности, кодирующей селективируемый ген млекопитающего, может быть оперативно связан с промотором (например, любым из примерных промоторов, описанных в настоящей публикации или известных в данной области).

Некоторые экспрессирующие векторы (например, любой из экспрессирующих векторов, описанных в настоящей публикации) могут содержать последовательность начала репликации млекопитающего и/или последовательность начала репликации прокариота. Последовательности начала репликации млекопитающих известны в данной области (например, Todorovic et al., *Front. Biosci.* 4: D859-D568, 1999; Aladjem, *Front. Biosci.* 9: 2540-2547, 2004; Hamlin, *Bioessays* 14: 651-659, 1992).

Последовательности начала репликации прокариот также известны в данной области (например, Marczynski et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 775-782, 1993).

Не ограничивающим примером вектора является плазида. Не ограничивающие примеры плазмид, предлагаемых в настоящем изобретении, показаны на фиг. 3 и 4. На фиг. 3 изображена плазида, кодирующая следующие элементы: нуклеиновую кислоту (например, кДНК), кодирующую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, промотор (например, промотор β -актина хомячка), связанный с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей белок α -галактозидазы-А человека, последовательность, кодирующую пептид CD52 человека, которая имеет стартовый кодон TTG, которая оперативно связана с 5'-концом последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, последовательность узнавания поли(А) (например, раннюю последовательность узнавания поли(А) SV40), которая оперативно связана с 3'-концом второй последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую селективируемый ген (маркер) млекопитающего (например, ген дигидрофолатредуктазы или ген глютаминсинтетазы человека или собаки), и промоторную последовательность (например, ранний промотор SV40), оперативно связанную с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей селективируемый ген (маркер) млекопитающего. На фиг. 4 изображена экспрессирующая плазида, которая содержит последователь-

ность, кодирующую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, промоторную последовательность (например, промотор и интрон CMV), оперативно связанную с 5'-концом последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, последовательность узнавания поли(А) (например, раннюю последовательность узнавания поли(А) SV40), оперативно связанную с 3'-концом последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, последовательность, кодирующую селективируемый ген (маркер) млекопитающего (например, ген глутаминсинтетазы), промоторную последовательность (например, промотор SV40), оперативно связанный с 5'-концом последовательности, кодирующей селективируемый ген (маркер) млекопитающего, последовательность начала репликации прокариот, последовательность, кодирующую прокариотический селективируемый ген (маркер) (например, ген резистентности к ампициллину), прокариотическую промоторную последовательность, оперативно связанную с 5'-концом прокариотического селективируемого гена (маркера), и эукариотическую последовательность начала репликации.

Экспрессирующим вектором может быть вирусный вектор. Не ограничивающие примеры вирусных векторов включают аденовирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, бакуловирусные векторы и ретровирусные векторы. Экспрессирующий вектор также может представлять собой плазмиду или космиду.

Клетки-хозяева

Также в настоящем изобретении предлагаются клетки-хозяева, которые содержат последовательность, кодирующую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, описанный в настоящей публикации. Последовательность может быть оперативно связана с промоторной последовательностью (например, любой из приведенных в качестве примера промоторных последовательностей, описанных в настоящей публикации, или любой из вирусных промоторных последовательностей или промоторных последовательностей млекопитающих, известных в данной области). Например, последовательность, кодирующая рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, и последовательность промоторной последовательности, оперативно связанной с 5'-концом последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, могут быть интегрированы в хромосому в клетке-хозяине. В других примерах последовательность, кодирующая рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, и промоторная последовательность, которая оперативно связана с 5'-концом последовательности, кодирующей рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, присутствуют в экспрессирующем векторе (например, любом из экспрессирующих векторов, описанных в настоящей публикации) в клетке-хозяине.

Способы введения нуклеиновых кислот (например, любой из нуклеиновых кислот или экспрессирующих векторов, описанных в настоящей публикации) в клетку (например, в клетку-хозяина млекопитающего) известны в данной области. Например, нуклеиновая кислота может быть введена в клетку с использованием липофекции, электропорации, опосредованной фосфатом кальция трансфекции, вирусной (например, ретровирусной) трансдукции, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции клеток, опосредованной дендримерами трансфекции, порации ультразвуком, оптической трансфекции, импалефекции, гидродинамической доставки или баллистической трансфекции.

Клеткой-хозяином может быть клетка млекопитающего любого типа. Например, клеткой-хозяином может быть клеточная линия, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO DG4, клетки CHO-K1s, клетки клона C02.31, клетки клона A14.13, клетки клона C02.57 и клетки клона F05.43), клетки миеломы Sp2.0 (например, NS/0), В-клетки, клетки гибридомы, Т-клетки, клетки эмбриональной почки человека (НЕК) (например, НЕК 293Е и НЕК 293F), эпителиальные клетки почки зеленой африканской мартышки (Vero) или эпителиальные клетки почки собак Мадин-Дарби (кокер-спаниель) (MDCK). Дополнительные клетки млекопитающих, которые можно культивировать с применением способов, описанных в настоящей публикации, известны в данной области. Клеткой-хозяином может быть, например, эпителиальная клетка, эндотелиальная клетка, лимфоцит, клетка почки, клетка легкого, Т-клетка, клетка миеломы или В-клетка. Некоторые клетки-хозяева можно выращивать в суспензионной культуре клеток или в культуре прикрепленных клеток.

Способы создания линии клеток млекопитающего

Также в настоящем изобретении предлагаются способы создания линии клеток млекопитающего, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, любого из других ферментов, перечисленных в табл. 1, или любого из других гликопротеидов, известных в данной области). Фиг. 5 представляет собой блок-схему, показывающую стадии, которые можно использовать для создания родительской клеточной линии, оптимизированной для экспрессии рекомбинантного гликопротеида. Такие способы могут включать в себя получение зависимой от сыворотки иммортализованной линии клеток и последовательное культивирование линии клеток млекопитающего в: (1) среде для культивирования клеток, которая содержит первую концентрацию (1X) сыворотки животного, в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 до примерно 25 суток, примерно от 5 до примерно 20 суток, примерно от 5 до примерно 15 суток, примерно от 5 до примерно 12 суток, примерно от 5 до примерно 11 суток, примерно от 5 до примерно 10 суток, примерно от 5 до примерно 9 суток, примерно от 5 до примерно 8 суток или примерно от 5 до

примерно 7 суток); (2) в среде для культивирования клеток, которая содержит сыворотку животного в концентрации примерно от 0,2X до примерно 0,4X (например, примерно от 0,2X до примерно 0,3X) в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 суток до примерно 25 суток, примерно от 5 суток до примерно 20 суток, примерно от 5 суток до примерно 15 суток, примерно от 5 суток до примерно 12 суток, примерно от 5 суток до примерно 11 суток, примерно от 5 суток до примерно 10 суток, примерно от 5 суток до примерно 9 суток, примерно от 5 суток до примерно 8 суток или примерно от 5 суток до примерно 7 суток); и (3) в среде для культивирования клеток, которая содержит сыворотку животного в концентрации примерно 0,01X до примерно 0,25X (например, примерно 0,01X до примерно 0,20X, примерно 0,01X до примерно 0,15X или примерно 0,01X до примерно 0,08X) в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 суток до примерно 25 суток, примерно от 5 суток до примерно 20 суток, примерно от 5 суток до примерно 15 суток, примерно от 5 суток до примерно 12 суток, примерно от 5 суток до примерно 11 суток, примерно от 5 суток до примерно 10 суток, примерно от 5 суток до примерно 9 суток, примерно от 5 суток до примерно 8 суток или примерно от 5 суток до примерно 7 суток), создание субклональных культур из отдельных клеток из культуры после последовательного культивирования и отбор субклона, который имеет приемлемую эффективность трансформации, клеточный рост в не содержащей сыворотки культуральной среды и экспрессию рекомбинантного белка; и культивирование отобранного субклона в не содержащей белка, не содержащей сыворотки, химически определенной среде в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 суток до примерно 25 суток, примерно от 5 суток до примерно 20 суток, примерно от 5 суток до примерно 15 суток, примерно от 5 суток до примерно 12 суток, примерно от 5 суток до примерно 11 суток, примерно от 5 суток до примерно 10 суток, примерно от 5 суток до примерно 9 суток, примерно от 5 суток до примерно 8 суток или примерно от 5 суток до примерно 7 суток); создание культур субклонов отдельных клеток из культуры после культивирования в не содержащей белка, не содержащей сыворотки, химически определенной среде; и отбор субклона, который имеет приемлемые эффективность трансформации, пиковую плотность клеток, ростовые свойства, показатель объемной продуктивности (VPR) и профиль гликозилирования гликопротеида, при этом отобранный субклон по п. (f) применим для экспрессии рекомбинантного гликопротеида.

Также предлагаются способы создания линии клеток млекопитающего, применимой для экспрессии рекомбинантного гликопротеида (например, любого из рекомбинантных белков, описанных в настоящей публикации или известных в данной области), которые включают в себя: (а) получение зависимой от сыворотки линии immortalized клеток и последовательное культивирование линии клеток млекопитающего в: (1) среде для культивирования клеток, которая содержит первую концентрацию (1X) (например, примерно 5%) сыворотки животного (например, фетальной сыворотки телят) в течение примерно от 1 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 2 суток до примерно 25 суток, примерно от 2 суток до примерно 20 суток, примерно от 2 суток до примерно 15 суток, примерно от 2 суток до примерно 12 суток, примерно от 2 суток до примерно 11 суток, примерно от 2 суток до примерно 10 суток, примерно от 2 суток до примерно 9 суток, примерно от 2 суток до примерно 8 суток или примерно от 2 суток до примерно 7 суток); (2) в среде для культивирования клеток, которая содержит сыворотку животного (например, фетальную сыворотку телят) в концентрации примерно от 0,2X до примерно 0,6X (например, примерно от 0,2X до примерно 0,5X) в течение примерно от 1 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 2 суток до примерно 25 суток, примерно от 2 суток до примерно 20 суток, примерно от 2 суток до примерно 15 суток, примерно от 2 суток до примерно 12 суток, примерно от 2 суток до примерно 11 суток, примерно от 2 суток до примерно 10 суток, примерно от 2 суток до примерно 9 суток, примерно от 2 суток до примерно 8 суток, или примерно от 2 суток до примерно 7 суток); и (3) среде для культивирования клеток, которая содержит сыворотку животного (например, фетальную сыворотку телят) в концентрации примерно от 0X до примерно 0,20X (например, примерно от 0X до примерно 0,15X, примерно от 0X до примерно 0,10X или примерно от 0X до примерно 0,05X) в течение примерно от 5 суток до примерно 30 суток (например, примерно от 5 суток до примерно 25 суток, примерно от 5 суток до примерно 20 суток, примерно от 5 суток до примерно 15 суток, примерно от 5 суток до примерно 12 суток, примерно от 5 суток до примерно 11 суток, примерно от 5 суток до примерно 10 суток, примерно от 5 суток до примерно 9 суток, примерно от 5 суток до примерно 8 суток или примерно от 5 суток до примерно 7 суток); (b) создание культур субклонов из отдельных клеток из культуры после последовательного культивирования, и отбор культуры субклона, который имеет приемлемую эффективность трансформации, клеточный рост в не содержащей сыворотки культуральной среде и экспрессию рекомбинантного белка (например, отбор культуры субклона, который имеет наилучшую эффективность трансформации, клеточный рост и экспрессию рекомбинантного белка по сравнению с другими тестируемыми культурами субклонов); (c) создание культур субклонов из отдельных клеток из отобранной на стадии (b) культуры субклона; и (d) отбор культуры субклона из отдельной клетки, созданного на стадии (c), который имеет приемлемую эффективность трансформации, пиковую плотность клеток (например, пиковую плотность клеток в не содержащей сыворотки среде), ростовые свойства (например, рост в не содержащей сыворотки среде), показатель объемной продуктивности (VPR) и экспрессию рекомбинантного белка, при этом отобранный на стадии (d) субклон применим для экспрессии рекомби-

нантного гликопротеида (например, культура субклона имеет наилучшую эффективность трансформации, пиковую плотность клеток, ростовые свойства, VPR и экспрессию рекомбинантного белка) по сравнению с другими тестируемыми культурами субклонов).

Также в настоящем изобретении предлагаются клетки млекопитающих или линии клеток млекопитающих, полученные любым из способов, описанных в настоящей публикации. Не ограничивающие примеры зависимых от сыворотки immortalized линий клеток, которые можно использовать в любом из способов, описанных в настоящей публикации, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки миеломы, В-клетки, клетки гибридомы, Т-клетки, клетки эмбриональной почки человека (НЕК), эпителиальные клетки почки зеленой африканской мартышки (Vero) и эпителиальные клетки почки собак Мадин-Дарби (кокер-спаниель) (MDCK). Другие зависимые от сыворотки линии immortalized клеток, которые можно использовать в любом из способов, описанных в настоящей публикации, известны в данной области. Например, зависимой от сыворотки линией immortalized клеток может быть линия эпителиальных клеток, линия эндотелиальных клеток, линия клеток лимфоцитов, линия клеток почки, линия клеток легкого, линия Т-клеток, линия клеток миеломы или линия В-клеток. В некоторых примерах зависимая от сыворотки линия immortalized клеток растет в суспензии. В других примерах зависимая от сыворотки линия immortalized клеток растет в культуре прикрепленных клеток.

В некоторых примерах зависимая от сыворотки линия immortalized клеток эндогенно не экспрессирует дигидрофолатредуктазу. Отобранный субклон (либо первый, либо второй субклон, отобранный с применением указанных способов) может быть выращен в суспензии.

Способы культивирования линии immortalized клеток млекопитающего известны в данной области. Способы определения эффективности трансфекции, клеточного роста в не содержащей сыворотки культуральной среде, экспрессии рекомбинантного белка, пиковой плотности клеток (например, пиковой плотности жизнеспособных клеток), ростовых свойств клеток, показателя объемной продуктивности и профиля гликозилирования полученного рекомбинантного белка хорошо известны в данной области. Например, эффективность трансфекции можно определить, регистрируя уровень экспрессии репортерного гена в экспрессирующей плазмиде, которой трансфицирована клетка (например, экспрессия такого репортерного гена может быть определена с использованием активируемой флуоресценцией сортировки клеток). Экспрессию рекомбинантного белка можно определить, например, регистрируя уровни рекомбинантного белка, присутствующего в среде для культуры ткани или в клетке, с использованием антитела, которое специфично связывается с рекомбинантным белком. Экспрессия рекомбинантного белка может представлять собой экспрессию одного или обоих белков: антитела или фермента (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или любого из ферментов, перечисленных на фиг. 1). Пиковую плотность клеток и клеточный рост можно оценить, например, измеряя плотность клеток (например, плотность живых клеток) с течением времени в культуре клеток (например, с использованием гемоцитометра или других коммерчески доступных автоматизированных счетчиков клеток). Показатель объемной продуктивности клеток можно определить с использованием способов, известных в данной области, посредством оценки уровней рекомбинантного белка, присутствующего в среде для культивирования клеток или в клетке, с течением времени. Профиль гликозилирования рекомбинантного гликопротеида, продуцированного клеткой, можно определить, например, используя любой из способов, описанных в разделе "Примеры" настоящего описания (например, дериватизацию 2-аминобензойной кислотой (AA) и капиллярный электрофорез с детекцией индуцируемой лазером флуоресценции).

Как хорошо известно в данной области, линию клеток млекопитающего, полученную способами, описанными в настоящей публикации, можно хранить при низкой температуре (например, ниже -20°C , ниже -30°C , ниже -40°C , ниже -50°C , ниже -60°C , ниже -70°C или ниже -80°C) для последующего применения. Способы приготовления исходных культур линии клеток млекопитающего для хранения при низких температурах описаны, например, в Hewitt, *Methods Mol. Biol.* 640: 83-105, 2010, и Phelan, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Appendix 3: 3G, 2006). В некоторых примерах линии клеток млекопитающих, полученные способами, описанными в настоящей публикации не подвергают воздействию содержащей сыворотку и/или содержащей сыворотку культуральной среды (например, до хранения и/или после хранения). В некоторых примерах линии клеток млекопитающих, полученные способами, описанными в настоящей публикации, культивируют только в культуральной среде, не содержащей полученного из организма животного компонента (ADC). В некоторых примерах линии клеток млекопитающих, полученные способами, описанными в настоящей публикации, культивируют только в не содержащей сыворотки, не содержащей белка, химически определенной среде для роста.

Способы получения рекомбинантного гликопротеида

В настоящем изобретении также предлагаются способы получения рекомбинантного гликопротеида (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, любого из ферментов, перечисленных на фиг. 1, или любого рекомбинантного гликопротеида, известного в данной области). Такие способы включают в себя получения клетки млекопитающего, полученной любым из способов, описанных в настоящей публикации, введение в клетку нуклеиновой кислоты (например, экспрессирующего вектора),

которая содержит последовательность, кодирующую гликопротеид (например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, любой из ферментов, описанных на фиг. 1, и любой другой гликопротеид, известный в данной области), культивирование клетки в не содержащей сыворотки культуральной среде в условиях, достаточных для получения гликопротеида, и сбор гликопротеида из клетки или ростовой культуральной среды. Также предлагаются рекомбинантные гликопротеиды (например, рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека), полученные любым из способов, описанных в настоящей публикации.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую гликопротеид, представляет собой экспрессирующий вектор (например, любой из экспрессирующих векторов, описанных в настоящей публикации). В других примерах нуклеиновая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую гликопротеид, интегрирована в хромосому клетки млекопитающего.

В некоторых примерах культивирование осуществляют, используя суспензионную культуру клеток. В других примерах культивирование осуществляют, используя множество микроносителей, которые имеют поверхность, обеспечивающую возможность прикрепления и роста клетки млекопитающего. Множество микроносителей могут иметь средний диаметр, например, примерно от 20 мкм до примерно 1 мм (например, примерно от 20 до примерно 250 мкм, примерно от 100 до примерно 250 мкм, примерно от 150 до примерно 250 мкм, примерно от 250 мкм и 500 мкм, примерно от 200 до примерно 300 мкм, примерно от 750 мкм до 1 мм, примерно от 200 до примерно 800 мкм, примерно от 200 до примерно 500 мкм или примерно от 500 до примерно 800 мкм), при этом микроносители имеют поверхность, которая является пермиссивной или стимулирует прикрепление клетки млекопитающего (например, любой из клеток млекопитающих, описанных в настоящей публикации или известных в данной области). В некоторых примерах, микроноситель может иметь одну или несколько пор (например, одну или несколько пор со средним диаметром примерно от 10 мкм до примерно 100 мкм). В некоторых случаях поверхности микроносителей и/или поверхность одной или нескольких пор во множестве микроносителей покрыты средством, которое стимулирует прикрепление клетки млекопитающего к микроносителю (например, прикрепление к наружной поверхности микроносителей и/или поверхностям пор микроносителя). Микроносители могут быть приблизительно сферическую или эллипсоидальную форму. В некоторых вариантах микроносители имеют наружную поверхность и/или поры микроносителя имеют поверхность, которая положительно заряжена (например, положительно заряжена вследствие присутствия N,N-диэтиламиноэтильных групп). Не ограничивающие примеры микроносителей, которые можно использовать в любом из способов, описанных в настоящей публикации, включают CytoPore™ 1 и CytoPore™ 2 (доступные из GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, New Jersey). Дополнительные примеры микроносителей, которые можно использовать для культивирования, общедоступны и известны в данной области.

В некоторых примерах культивирование осуществляют, используя биореактор. Биореактор может иметь объем, например, примерно от 1 до примерно 10000 л (например, примерно от 1 до примерно 50 л, примерно от 50 до примерно 500 л, примерно от 500 до примерно 1000 л, от 500 до примерно 5000 л, примерно от 500 до примерно 10000 л, примерно от 5000 до примерно 10000 л, примерно от 1 до примерно 10000 л, примерно от 1 до примерно 8000 л, примерно от 1 до примерно 6000 л, примерно от 1 до примерно 5000 л, примерно от 100 до примерно 5000 л, примерно от 10 до примерно 100 л, примерно от 10 до примерно 4000 л, примерно от 10 до примерно 3000 л, примерно от 10 до примерно 2000 л, или примерно от 10 до примерно 1000 л). Количество жидкой культуральной среды, присутствующей в биореакторе, может составлять, например, примерно от 0,5 до примерно 5000 л (например, примерно от 0,5 до примерно 25 л, примерно от 25 до примерно 250 л, примерно от 250 до примерно 500 л, от 250 до примерно 2500 л, примерно от 250 до примерно 5000 л, примерно от 2500 до примерно 5000 л, примерно от 0,5 до примерно 5000 л, примерно от 0,5 до примерно 4000 л, примерно от 0,5 до примерно 3000 л, примерно от 0,5 до примерно 2500 л, примерно от 50 до примерно 2500 л, примерно от 5 до примерно 50 л, примерно от 5 до примерно 2000 л, примерно от 5 л до примерно 1500 л, примерно от 5 до примерно 1000 л или примерно от 5 до примерно 500 л). Культивирование клетки можно осуществлять, например, используя биореактор с периодической подпиткой или перфузионный биореактор. Культивирование можно осуществлять с использованием культивирования с периодической подпиткой или перфузионного культивирования (например, в биореакторе).

Внутренняя поверхность любого из биореакторов, описанных в настоящей публикации, может иметь по меньшей мере одно покрытие (например, по меньшей мере одно покрытие желатином, коллагеном, поли-L-орнитинном, полистиролом и ламинином), и как известно в данной области, один или несколько входных отверстий для барботирования с использованием O₂, CO₂ и N₂ жидкой культуральной среды, и перемешивающий механизм для встряхивания жидкой культуральной среды. Биореактор может осуществлять инкубацию культуры клеток в контролируемой увлажненной атмосфере (например, при влажности больше чем 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или влажности 100%). Биореактор также может быть оборудован механическим устройством, которое способно удалять объем жидкой культуральной среды из биореактора, и необязательно фильтр в механическом устройстве, который удаляет

клетки из жидкой культуральной среды в ходе процесса переноса жидкой культуральной среды из биореактора (например, система фильтрации в переменном тангенциальном потоке (АТФ) или в тангенциальном потоке (ТФФ)). Культивирование может включать в себя экспозицию жидкой культуральной среды в биореактор в атмосфере, которая содержит не более или примерно 15% CO₂ (например, не более или примерно 14% CO₂, 12% CO₂, 10% CO₂, 8% CO₂, 6% CO₂, 5% CO₂, 4% CO₂, 3% CO₂, 2% CO₂, или не более или примерно 1% CO₂).

Культивирование можно осуществлять при температуре примерно от 31°C до примерно 40°C. Специалистам будет понятно, что температура может меняться в конкретной временной точке (точках) во время культивирования, например, в почасовом или суточном режиме. Например, температура может меняться или сдвигаться (например, повышаться или понижаться) примерно через одни сутки, две суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, семь суток, восемь суток, девять суток, десять суток, одиннадцать суток, двенадцать суток, четырнадцать суток, пятнадцать суток, шестнадцать суток, семнадцать суток, восемнадцать суток, девятнадцать суток или примерно двадцать суток или больше после начального посева в биореактор клетки млекопитающего). Например, температура может быть сдвинута вверх (например, изменение вплоть до или примерно на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или вплоть до или примерно на 20°C). Например, температура может быть сдвинута вниз (например, изменение больше чем 0,05°C или примерно на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или вплоть до или примерно на 20°C).

Культивирование может быть осуществлено с использованием не содержащей белка, не содержащей сыворотки, химически определенной среды. Не ограничивающие примеры таких сред известны в данной области и коммерчески доступны. Не ограничивающие примеры применимой культуральной среды включают, например, CD CHO, Opti CHO и Forti CHO (которые все доступны из Life Technologies; Grand Island, NY), среду Hycell CHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), среду Ex-cell CD CHO Fusion (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO) и среду PowerCHO (Lonza Group, Ltd.; Basel, Switzerland).

Клетка млекопитающего может представлять собой любую из клеток млекопитающих, описанных в настоящей публикации. Например, клеткой млекопитающего может быть клетка CHO. Клеткой млекопитающего может быть клетка, которая эндогенно не экспрессирует дигидрофолатредуктазу (например, клетка CHO, которая эндогенно не экспрессирует дигидрофолатредуктазу).

Рекомбинантный гликопротеид может представлять собой фермент (например, белок α -галактозидазы-А человека, любой из белков, перечисленных на фиг. 1, или любой другой гликопротеид, известный в данной области) или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых примерах нуклеиновая кислота (например, экспрессирующий вектор) содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97%, 98, 99 или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 1. Нуклеиновая кислота (например, экспрессирующий вектор) может содержать промоторную последовательность, оперативно связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеид, последовательность, кодирующую пептид белка CD52 человека со стартовым кодоном TTG, оперативно связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеид, и последовательность, кодирующую сайт узнавания поли(А), оперативно связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеид. Например, промоторная последовательность может быть выбрана из группы, состоящей из промотора gpS21 хомячка, промотора β -актина хомячка и раннего промотора SV40. Последовательность, кодирующая сайт узнавания поли(А), может представлять собой раннюю последовательность узнавания поли(А) SV40. В некоторых примерах промоторной последовательностью может являться промотор β -актина хомячка, и последовательностью узнавания поли(А) может являться ранняя последовательность узнавания поли(А) SV40. В некоторых примерах нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую глутаминсинтетазу человека или собаки (например, при этом 5'-конец нуклеиновой кислоты, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки, оперативно связан с ранним промотором SV40, а 3'-конец нуклеиновой кислоты, кодирующей глутаминсинтетазу человека или собаки, оперативно связан с ранним интроном SV40 и сигнальной поли(А)-последовательностью). В некоторых примерах нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую дигидрофолатредуктазу (DHFR) (например, DHFR человека или мыши) (например, при этом 5'-конец нуклеиновой кислоты, кодирующей дигидрофолатредуктазу, оперативно связан с ранним промотором SV40, а 3'-конец нуклеиновой кислоты, кодирующей дигидрофолатредуктазу, оперативно связан с ранним интроном SV40 и сигнальной поли(А)-последовательностью).

Культивирование может быть осуществлено с использованием перфузионного биореактора. Перфузионное культивирование хорошо известно в данной области и включает в себя удаление из биореактора первого объема первой жидкой культуральной среды (например, которая содержит любую концентрацию клеток млекопитающих, например, первого объема первой жидкой культуральной среды, которая по существу не содержит клеток) и добавление к первой жидкой культуральной среде второго объема вто-

рой жидкой культуральной среды. Удаление и добавление может быть осуществлено одновременно или последовательно или в результате сочетания двух способов. Кроме того, удаление и добавление можно осуществлять непрерывно (например, со скоростью, которая удаляет и заменяет объем, составляющий от 0,1 до 800% (например, от 1 до 700%, от 1 до 600%, от 1 до 500%, от 1 до 400%, от 1 до 350%, от 1 до 300%, от 1 до 250%, от 1 до 100%, от 100 до 200%, от 5 до 150%, от 10 до 50%, от 15 до 40%, от 8 до 80% и от 4 до 30%) объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды, в течение любого заданного периода времени (например, в течение 24-часового периода, в течение постепенно увеличиваемого периода времени примерно от 1 до примерно 24 ч или в течение постепенно увеличиваемого периода времени, составляющего больше чем 24 часа)) или периодически (например, один раз каждые три дня, через день, один раз в день, дважды в день, три раза в день, четыре раза в день или пять раз в день) или в любом сочетании указанных периодов. При периодичности объем, которые удаляют или заменяют (например, в пределах примерно 24-часового периода, в пределах постоянно увеличиваемого периода, составляющего примерно от 1 до примерно 24 ч, или в пределах постоянно увеличиваемого периода времени, составляющего более 24 ч) может составлять, например, от 0,1 до 800% (например, от 1 до 700%, от 1 до 600%, от 1 до 500%, от 1 до 400%, от 1 до 300%, от 1 до 200%, от 1 до 100%, от 100 до 200%, от 5 до 150%, от 10 до 50%, от 15 до 40%, от 8 до 80% и от 4 до 30%) объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды. Удаляемый первый объем первой жидкой культуральной среды и добавляемый второй объем второй жидкой культуральной среды в некоторых случаях может поддерживаться приблизительно одним и тем же в течение каждого 24-часового периода (или альтернативно в течение постепенно увеличиваемого периода времени, составляющего примерно от 1 до примерно 24 ч, или в течение постепенно увеличиваемого периода времени, составляющего более 24 ч) на протяжении всего или части периода культивирования. Как известно в данной области, скорость, с которой удаляют первый объем первой жидкой культуральной среды (объем/единица времени), и скорость, с которой добавляют второй объем второй жидкой культуральной среды (объем/единица времени) могут варьировать. Скорость, с которой удаляют первый объем первой жидкой культуральной среды (объем/единица времени), и скорость, с которой добавляют второй объем второй жидкой культуральной среды (объем/единица времени) могут быть примерно одинаковыми или могут быть разными.

Альтернативно, удаляемый и добавляемый объем может меняться (например, постепенно увеличиваться) в течение каждого 24-часового периода (или альтернативно, в течение постепенно увеличиваемого периода времени от 1 до примерно 24 ч или постепенно увеличиваемого периода времени более 24 ч) в ходе периода культивирования. Например, удаляемый объем первой жидкой культуральной среды и добавляемый объем второй жидкой культуральной среды в течение каждого 24-часового периода (или альтернативно, в течение постепенно увеличиваемого периода времени от 1 до примерно 24 ч или постепенно увеличиваемого периода времени более 24 ч) в ходе периода культивирования можно увеличивать (например, постепенно или ступенчато) на протяжении периода культивирования от объема, который составляет от 0,5 до примерно 20% объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды, до примерно от 25 до примерно 150% объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды.

Специалистам будет понятно, что первая жидкая культуральная среда и вторая жидкая культуральная среда могут быть средой одного типа (например, не содержащей сыворотки или не содержащей сыворотки, не содержащей белка, химически определенной средой). В других случаях первая жидкая культуральная среда и вторая жидкая культуральная среда могут быть разными.

Первый объем первой жидкой культуральной среды может быть удален, например, с использованием механической системы и/или за счет просачивания или самотеком объема через стерильную мембрану с пределом отсека по молекулярной массе, который исключает присутствие клеток млекопитающих в объеме.

Второй объем второй жидкой культуральной среды может быть добавлен к первой жидкой культуральной среде автоматически, например, с использованием насоса для перфузии. В некоторых случаях удаление первого объема первой жидкой культуральной среды (например, первого объема первой жидкой культуральной среды, который по существу не содержит клеток млекопитающих) и добавление к первой жидкой культуральной среде второго объема второй жидкой культуральной среды не происходит в течение по меньшей мере 1 ч (например, в пределах 2 ч, в пределах 3 ч, в пределах 4 ч, в пределах 5 ч, в пределах 6 ч, в пределах 7 ч, в пределах 8 ч, в пределах 9 ч, в пределах 10 ч, в пределах 12 ч, в пределах 14 ч, в пределах 16 ч, в пределах 18 ч, в пределах 24 ч, в пределах 36 ч, в пределах 48 ч, в пределах 72 ч, в пределах 96 ч или после 96 ч) от посева в биореактор клетки млекопитающего.

Альтернативно или дополнительно, культивирование можно осуществлять с использованием биореактора с периодической подпиткой. Такое культивирование известно в данной области и включает в себя, на протяжении большей части периода культивирования, добавление (например, периодическое или непрерывное добавление) к первой жидкой культуральной среде второго объема второй жидкой культуральной среды. Добавление второй жидкой культуральной среды можно осуществлять непрерывно (например, со скоростью, которая позволяет добавлять объем, составляющий от 0,1 до 300% (например, от 1 до 250%, от 1 до 100%, от 100 до 200%, от 5 до 150%, от 10 до 50%, от 15 до 40%, от 8 до 80% и

от 4 до 30%) объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды, на протяжении любого заданного периода времени (например, на протяжении 24-часового периода, на протяжении постепенно увеличиваемого периода времени примерно от 1 до примерно 24 ч или на протяжении постепенно увеличиваемого периода времени, составляющего более 24 ч)) или периодически (например, один раз каждые три дня, через день, один раз в день, дважды в день, три раза в день, четыре раза в день или пять раз в день) или в любом сочетании указанных периодов. При периодичности объем, который добавляют (например, в пределах примерно 24-часового периода, в пределах постоянно увеличиваемого периода, составляющего примерно от 1 до примерно 24 ч, или в пределах постоянно увеличиваемого периода времени, составляющего более 24 ч) может составлять, например, от 0,1 до 300% (например, от 1 до 200%, от 1 до 100%, от 100 до 200%, от 5 до 150%, от 10 до 50%, от 15 до 40%, от 8 до 80% и от 4 до 30%) объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды. Добавляемый второй объем второй жидкой культуральной среды в некоторых случаях может поддерживаться приблизительно одним и тем же на протяжении каждого 24-часового периода (или альтернативно, в течение постепенно увеличиваемого периода времени от 1 до примерно 24 ч или постепенно увеличиваемого периода времени более 24 ч) в ходе периода культивирования. Например, добавляемый объем второй жидкой культуральной среды на протяжении каждого 24-часового периода (или альтернативно, в течение постепенно увеличиваемого периода времени от 1 до примерно 24 ч или постепенно увеличиваемого периода времени более 24 ч) в ходе периода культивирования можно увеличивать (например, постепенно или ступенчато) в течение периода культивирования от объема, который составляет от 0,5 до примерно 20% объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды до объема, составляющего примерно от 25 до примерно 150% объема биореактора или объема первой жидкой культуральной среды. Скорость, с которой добавляют второй объем второй жидкой культуральной среды (объем/единица времени) может быть примерно одинаковым на протяжении всего или части периода культивирования.

Специалистам будет понятно, что первая жидкая культуральная среда и вторая жидкая культуральная среда могут представлять собой среду одного и того же типа (например, не содержащую белка культуральную среду или не содержащую сыворотки, не содержащую белка, химически определенную среду). В других случаях первая жидкая культуральная среда может быть такого типа, который отличается от второй жидкой культуральной среды. Объем второй жидкой культуральной среды можно добавлять к первой жидкой культуральной среде автоматически, например, с использованием насоса для перфузии.

В некоторых случаях добавление к первой жидкой культуральной среде второго объема второй жидкой культуральной среды не происходит вплоть до момента по меньшей мере через 1 ч после, но не более чем через 7 суток после посева в биореактор клетки млекопитающего (например, вплоть до по меньшей мере через 2 ч, в пределах 3 ч, в пределах 4 ч, в пределах 5 ч, в пределах 6 ч, в пределах 7 ч, в пределах 8 ч, в пределах 9 ч, в пределах 10 ч, в пределах 12 ч, в пределах 14 ч, в пределах 16 ч, в пределах 18 ч, в пределах 24 ч, в пределах 36 ч, в пределах 48 ч, в пределах 72 ч, в пределах 96 ч или через 96 ч после, но не более чем, через 7 суток после посева в биореактор клетки млекопитающего). Среду для культивирования клеток в культурах с периодической подпиткой обычно собирают в конце периода культивирования, однако среду для культивирования клеток в культурах с периодической подпиткой также можно собирать в одной или нескольких временных точках в ходе периода культивирования.

Специалистам будет понятно, что любой из различных параметров культивирования (например, биореактор, объемы, скорости или частоты замены объемов культуры, встряхивание, температуры, культуральную среду и/или концентрации CO₂), указанные в настоящем описании, можно использовать в любом сочетании при осуществлении описанных способов.

Может быть осуществлена дополнительная стадия выделения рекомбинантного гликопротеида. Как хорошо известно в данной области, такие способы различаются в зависимости от физических свойств и активности гликопротеида. Например, следует учитывать такие параметры, как специфичность связывания гликопротеида (например, активность связывания субстрата или антигена), суммарный заряд и/или размер, при планировании стадий выделения рекомбинантного гликопротеида (например, из культуральной среды или из клетки). Один или несколько из следующих способов можно применять для выделения рекомбинантного гликопротеида (например, рекомбинантного гликопротеида, полученного с использованием любого из способов, описанных в настоящей публикации): хроматографию на аффинной колонке, хроматографию на ионообменной (например, катионообменной или анионообменной) колонке, эксклюзионную колоночную хроматографию по размеру, хроматографию на колонке с обращенной фазой, фильтрацию и преципитацию. Не ограничивающие способы выделения рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека описаны в примерах.

В некоторых примерах выделение рекомбинантного гликопротеида из жидкой культуральной среды может быть осуществлено с использованием интегрированного непрерывного способа (например, способа, включающего в себя использование по меньшей мере двух состоящих из множества колонок хроматографических систем (MCCS)). Не ограничивающие примеры интегрированных непрерывных способов выделения рекомбинантного гликопротеида описаны в предварительных заявках на выдачу патента США № 61/775060 и 61/856390, и в WO 14/137903. Не ограничивающие примеры интегрированных непрерывных способов выделения rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, из жидкой культу-

ральной среды описаны ниже.

Способы, описанные в настоящей публикации, могут дополнительно включать в себя приготовление препарата изолированного рекомбинантного гликопротеида в фармацевтически приемлемом эксципиенте или буфере (например, для введения субъекту). Такие способы могут дополнительно включать в себя стерильную фильтрацию, инактивацию вирусов, УФ-облучение и/или лиофилизацию или их сочетание.

Интегрированные и непрерывные способы выделения белка rhAGA

Белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, может быть выделен с применением интегрированного и непрерывного способа. Способы выделения рекомбинантного белка с применением интегрированного и непрерывного процесса и подробности, относящиеся к стадиям таких способов, известны в данной области. См. WO 14/137903 и публикацию заявки на выдачу патента США № 2014/0225994. Кроме того, в WO 14/137903 также описаны системы и оборудование, которое можно использовать для осуществления таких интегрированных и непрерывных способов.

Например, интегрированный и непрерывный способ выделения белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, может включать в себя (a) получение жидкой культуральной среды, содержащей белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, которая по существу не содержит клеток, при этом жидкую культуральную среду подают в первую состоящую из множества хроматографическую систему (MCCS1); (b) улавливание белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, в жидкой культуральной среде с использованием MCCS1, при этом элюат из MCCS1, содержащий белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, непрерывно подают во вторую состоящую из множества колонок хроматографическую систему (MCCS2); и (c) очистку и доочистку белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, с использованием MCCS2, при этом элюат из MCCS2 представляет собой выделенный белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, или лекарственное вещество в виде белка rhAGA, и способ интегрирован и осуществляется непрерывно, начиная с указанной жидкой культуральной среды до элюата из MCCS2, который представляет собой выделенный белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, или лекарственное вещество в виде белка rhAGA.

MCCS1 и/или MCCS2 могут, например, осуществлять по меньшей мере две элементарные операции. В некоторых вариантах MCCS1 или MCCS2 или обе системы предполагают переключение колонок. В некоторых вариантах MCCS1 осуществляет элементарные операции улавливания белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, и инактивацию вирусов. В некоторых вариантах MCCS2 осуществляет элементарные операции очистки и доочистки белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении.

В MCCS1 и/или MCCS2 можно использовать, например, по меньшей мере две хроматографические колонки. В MCCS1 и/или MCCS2 можно использовать, например, по меньшей мере две хроматографические мембраны. В MCCS1 и/или MCCS2 можно использовать, например, по меньшей мере одну хроматографическую колонку и по меньшей мере одну хроматографическую мембрану.

MCCS1 может представлять собой, например, периодическую противоточную хроматографическую систему (PCCS1). PCCS1 может представлять собой, например, состоящую из четырех колонок PCCS. В некоторых вариантах четыре колонки в состоящей из четырех колонок PCCS могут осуществлять элементарную операцию улавливания белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, из жидкой культуральной среды. Улавливание можно осуществлять с использованием, например, аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии, анионообменной хроматографии или хроматографии на молекулярных ситах. Аффинность хроматография может быть осуществлена с использованием механизма улавливания, выбранного, например, из механизма улавливания на основе связывания белка-А, механизма улавливания на основе связывания субстрата, механизма улавливания с использованием антитела или фрагмента антитела, механизма улавливания на основе связывания аптамера и механизма на основе связывания кофактора. Элюат, содержащий белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, с трех из четырех колонок в состоящей из четырех колонок PCCS может подаваться на четвертую колонку состоящей из четырех колонок PCCS. Четвертая колонка состоящей из четырех колонок PCCS может осуществлять, например, элементарную операцию инактивации вирусов, посредством выдерживания элюата, содержащего белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, при низком значении pH для инактивации вирусов. Например, четвертая колонка состоящей из четырех колонок PCCS может выдерживать элюат, содержащий белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, при низком значении pH для инактивации вирусов в течение периода, составляющего примерно от 10 мин до примерно 1,5 ч.

В некоторых вариантах MCCS2 может представлять собой периодическую противоточную хроматографическую систему (PCCS2). В некоторых примерах способ дополнительно включает в себя стадию корректировки pH элюата с четвертой колонки состоящей из четырех колонок PCCS с использованием с использованием встроенной в систему емкости для корректировки буфера перед тем как элюат с четвертой колонки состоящей из четырех колонок PCCS подают в PCCS2.

PCCS2 может, например, содержать три хроматографических колонки и хроматографическую мембрану. Три хроматографических колонки в PCCS2 могут осуществлять, например, элементарную опера-

цию очистки белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении (например, посредством катионообменной или анионообменной хроматографии). Элюат с трех колонок в PCCS2 можно подавать, например, на хроматографическую мембрану в PCCS2. Хроматографическая мембрана в PCCS2 может, например, осуществлять элементарную операцию доочистки белка rhAGA, предлагаемого в настоящем изобретении, в элюате с трех хроматографических колонок в PCCS2 (например, посредством катионообменной или анионообменной хроматографии). Проходящий элюат и промывка с хроматографической мембраны может представлять собой выделенный белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, или лекарственное вещество белка rhAGA.

Некоторые примеры дополнительно включают корректировку концентрации ионов в элюате с трех колонок в PCCS2 с использованием встроенной в систему корректировки буфером перед тем, как элюат с трех колонок в PCCS2 подают на хроматографическую мембрану в PCCS2. Некоторые варианты дополнительно включают в себя использование бака разрыва потока между PCCS1 и PCCS2. Некоторые примеры дополнительно включают фильтрацию элюата из PCCS1 перед тем, как его подают в PCCS2. Некоторые варианты дополнительно включают в себя фильтрацию жидкой культуральной среды перед ее подачей в MCCS1.

Фармацевтические композиции и наборы

Также в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции, которые содержат по меньшей мере один (например, один, два, три или четыре) рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении. Два или более (например, два, три или четыре) из любых рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, предлагаемых в настоящем изобретении, могут присутствовать в фармацевтической композиции в любом сочетании. Также в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции, которые содержат, состоят или по существу состоят из рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемого носителя.

Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может не иметь регистрируемого уровня или не иметь белка, липида, углевода, нуклеиновой кислоты и контаминанта (например, любого из контаминантов, описанных в настоящей публикации), присутствующих в животном продукте (например, в сыворотке животного, плазме животного или продукте, полученном из крови животного).

Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован в культуре клеток, в которой использовали только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной среды. Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован в культуре клеток, в которой использовали только не содержащую белка культуральную среду и/или химически определенную культуральную среду. Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может содержать белок rhAGA, предлагаемый в настоящем изобретении, который продуцирован культурой клеток, в которой использовали только культуральную среду, выбранную из группы, состоящей из не содержащей белка, не содержащей сыворотки и химически определенной культуральной среды, и выделен с применением интегрированного и непрерывного способа (например, любого из приведенных в качестве примера интегрированных и непрерывных способов, описанных в настоящей публикации или в WO 14/137903).

Любая из фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, может иметь улучшенный профиль безопасности (например, пониженный риск контаминации (например, любым из приведенных в качестве примера контаминантов, описанных в настоящей публикации или известных в данной области), по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей белок rhAGA (например, любой из белков rhAGA, предлагаемых в настоящем изобретении), который получен способом, который включает в себя применение культуральной среды, содержащей животный продукт (например, сыворотку животного, плазму животного или фактор или белок крови животного).

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены любым способом, известным в данной области. Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют преимущества, так как они имеют пониженный риск или уровень контаминации (например, пониженный риск или уровень вирусной контаминации) и/или имеют пониженную гетерогенность гликоформ, присутствующих в композиции.

Фармацевтические композиции готовят так, чтобы они были совместимы с предполагаемым путем их введения (например, внутривенным, внутриартериальным, внутримышечным, интрадермальным, подкожным или внутрибрюшинным). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, например, стерильный разбавитель (например, стерильную воду или физиологический раствор соли), летучее масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители, противобактериальные или антигрибковые средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота, тимеросал и тому подобные, антиоксиданты, такие

как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия, хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота, буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для изотоничности, такие как сахара (например, декстроза), полиспирты (например, маннит или сорбит) или соли (например, хлорид натрия) или любое их сочетание. Липосомные суспензии также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей (см., например, патент США № 4522811). Препараты композиций могут быть приготовлены и заключены в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы, содержащие множество доз. При необходимости (как, например, в инъекционных препаратах), нужная текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, или поверхностно-активного вещества. Всасывание рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека может пролонгировано за счет включения средства, которое замедляет всасывание (например, моностеарата алюминия и желатина). Альтернативно, может быть достигнуто контролируемое высвобождение с использованием имплантатов и микроинкапсулированных систем доставки, которые могут содержать биологически разрушаемые биосовместимые полимеры (например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, сложные полиортофосфаты и полимолочную кислоту; Alza Corporation and Nova Pharmaceutical, Inc.).

Композиции, которые содержат один или несколько любых рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, могут быть приготовлены для парентерального (например, внутривенного, внутриаартериального, внутримышечного, интрадермального, подкожного или внутривнутрибрюшинного) введения с стандартной лекарственной форме (т.е. в виде физически дискретных единиц, содержащих предварительно определяемое количество активного белка, для простоты введения и однородности дозы).

Токсичность и терапевтическая эффективность композиций может быть определена стандартными фармацевтическими способами в культурах клеток или у экспериментальных животных (например, обезьян). Можно, например, определить ЛД₅₀ (дозу, летальную для 50% популяции) и ЭД₅₀ (дозу, терапевтически эффективную для 50% популяции): при этом терапевтический индекс представляет собой отношение ЛД₅₀:ЭД₅₀. Предпочтительны средства, которые имеют высокие терапевтические индексы. В том случае, когда средство оказывает нежелательный побочный эффект, следует соблюдать осторожность, чтобы минимизировать потенциальное повреждение (т.е. уменьшить нежелательные побочные эффекты). Токсичность и терапевтическую эффективность можно определить другими стандартными фармацевтическими способами.

Данные, полученные в результате анализов на культурах клеток и исследований на животных, можно использовать для приготовления подходящей дозы любого данного рекомбинантного гликопротеида (например, любого из рекомбинантных гликопротеидов, описанных в настоящей публикации) для применения для субъекта (например, человека). Терапевтически эффективное количество одного или нескольких (например, одного, двух, трех или четырех) рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека (например, любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации) будет представлять собой количество, которое позволяет лечить болезнь Фабри у субъекта (например, снижает риск развития или предотвращает развитие болезни Фабри у субъекта (например, у человека, у которого идентифицировано наличие повышенного риска развития болезни Фабри)), снижает тяжесть, частоту и/или продолжительность одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта (например, у человека) (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения), снижает накопленные уровни гликофинголипидов с концевыми остатками α -галактозила, таких как глоботриаозилцерамид, у субъекта (например, человека), имеющего болезнь Фабри (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения)). Эффективность и дозирование любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации, может быть определена медицинским работником или ветеринаром с использованием способов, известных в данной области, а также в результате наблюдения одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта (например, у человека). Некоторые факторы могут влиять на дозы и время введения, необходимые для эффективного лечения субъекта (например, тяжесть заболевания или расстройства, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и наличие других заболеваний).

Любая из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации, может дополнительно содержать одно или несколько (например, два, три, четыре или пять) дополнительных терапевтических средств. Не ограничивающие примеры дополнительных терапевтических средств, которые могут быть включены в любую из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации, включают: противосудорожные средства (например, фенитоин, карбамазепин, фенобарбитал, метилфенобарбитал, баркесаклон, бензодиазепин, клобазан, клоназепам, клоразепат, диазепам, мидазолам, лоразепам, нитразепам, темазепам, ниметазепам, фелбамат, карбазепин, оксакарбазепин, ацетат эсликарбазепина, виgabатрин, прогабид, тиагабин, топирамат, габапентин, прегабалин, этотонин, фенитоин, мефенитоин, фосфенитоин, параметадион, триметадион, этадион, бекламид, примидон, бриварацетам, леветирацетам,

селетрацетам, этосуксимид, фенсуксимид, месуксимид, ацетазоламид, сультам, метазоламид, зонисамид, ламотригин, фенетурид, фенацемид, вальпромид и вальноктамид) и противорвотные средства (например, метоклопрамид, прохлорперазин, ализаприд, доласетрон, гранисетрон, ондасетрон, трописетрон, палонсетрон, миртазапин, домперидон, оланзапин, дроперидол, галоперидол, хлорпромазин, прохлорперазин, апрепитант и касопитант).

Примеры доз включают миллиграммовые или микрограммовые количества любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации, на килограмм массы субъекта (например, примерно 50 мкг/кг до примерно 3 мг/кг; примерно от 100 мкг/кг до примерно 2,5 мг/кг; примерно от 100 мкг/кг до примерно 2,0 мг/кг; примерно от 500 мкг/кг до примерно 1,5 мг/кг; примерно от 500 мкг/кг до примерно 1,5 мг/кг; или примерно от 800 мкг/кг до примерно 1,2 мг/кг). Примеры доз также могут включать миллиграммовые или микрограммовые количества одного или нескольких из любых одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, описанных в настоящей публикации, на килограмм массы субъекта (например, примерно от 1 мкг/кг до примерно 500 мг/кг; примерно от 100 мкг/кг до примерно 500 мг/кг; примерно от 100 мкг/кг до примерно 50 мг/кг; примерно от 10 мкг/кг до примерно 5 мг/кг; примерно от 10 мкг/кг до примерно 0,5 мг/кг; или примерно от 1 мкг/кг до примерно 50 мкг/кг для каждого вводимого дополнительного терапевтического средства). Хотя такие дозы охватывают широкий диапазон, специалисту в данной области будет понятно, что терапевтические средства, включая рекомбинантный белок α -галактозидазы-А и дополнительные терапевтические средства, описанные в настоящей публикации, варьируют по своей удельной активности, и эффективные количества могут быть определены способами, известными в данной области. Обычно сначала вводят относительно низкие дозы, и лечащий медицинский работник или ветеринар (в случае терапевтического применения) или исследователь (когда он работает еще на стадии разработки) может последовательно и постепенно увеличивать дозу вплоть до получения адекватного ответа. Кроме того, понятно, что конкретный уровень дозы для любого конкретного субъекта будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, род и питание субъекта, время введения, путь введения, скорость экскреции и время полужизни рекомбинантного гликопротеида (например, рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека) или дополнительных терапевтических средства *in vivo*.

Фармацевтические композиции могут находиться в емкости, упаковке или дозаторе вместе с инструкциями по введению.

Например, один или несколько рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, предлагаемых в настоящем изобретении, могут быть упакованы в стерильный флакон в виде лиофилизированного порошка или лепешки для последующего перерастворения и введения. Лيوфилизированный порошок или лепешка, которые содержат рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, могут содержать один или несколько стабилизаторов (например, один или несколько из следующих средств: маннит, моногидрат одноосновного фосфата натрия и гептагидрат двухосновного фосфата натрия). Примеры лиофилизированного порошка или лепешки, которые содержат рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, включают: 37 мг рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, 222 мг маннита, 20,4 мг моногидрата одноосновного фосфата натрия и 59,2 мг гептагидрата двухосновного фосфата натрия. Перед применением или введением рекомбинантного белка α -галактозидазы человека лиофилизированный порошок или лепешку перерастворяют путем инъекции 7,2 мл стерильной воды для инъекций, USP, во флакон с получением раствора 5,0 мг рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека на миллилитр. Такой восстановленный раствор может быть дополнительно разбавлен инъекцией 0,9% хлорида натрия, USP, до конечного объема 500 мл перед внутривенным введением субъекту в дозе примерно 1 мг/кг. Также включены наборы, которые содержат флакон с лиофилизированной лепешкой или порошком рекомбинантной α -галактозидазы человека (которые описаны в данном абзаце), инструкции по перерастворению лепешки или порошка (как описано в данном абзаце) и инструкции по внутривенному введению раз в две недели восстановленного раствора субъекту в дозе примерно 1,0 мг/кг.

Другой пример лиофилизированного порошка или лепешки, которые содержат рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека содержит: 5,5 мг рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, 33,0 мг маннита, 3,0 мг моногидрата одноосновного фосфата натрия и 8,8 мг гептагидрата двухосновного фосфата натрия. Перед применением или введением рекомбинантного белка α -галактозидазы человека лиофилизированный порошок или лепешку перерастворяют путем инъекции 1,1 мл стерильной воды для инъекций, USP, во флакон с получением раствора 5,0 мг рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека на миллилитр. Такой восстановленный раствор может быть дополнительно разбавлен инъекцией 0,9% хлорида натрия, USP, до конечного объема 500 мл перед внутривенным введением субъекту в дозе примерно 1 мг/кг. Также включены наборы, которые содержат флакон с лиофилизированной лепешкой или порошком рекомбинантной α -галактозидазы человека (которые описаны в данном абзаце), инструкции по перерастворению лепешки или порошка (как описано в данном абзаце) и инструкции по внутривенному введению раз в две недели восстановленного раствора субъекту в дозе примерно 1,0 мг/кг.

Также в настоящем изобретении предлагаются наборы, которые содержат по меньшей мере одну дозу любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах наборы могут дополнительно содержать изделие для использования при введении фармацевтической композиции (например, любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации) млекопитающему (например, человеку) (например, шприц, например, предварительно заполненный шприц). Некоторые примеры наборов содержат одну или несколько доз (например, по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, двадцать, тридцать или сорок доз) (например, доз для внутривенного, подкожного или внутривентриального введения) любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации. В некоторых примерах набор дополнительно содержит инструкции по введению фармацевтической композиции (или дозы фармацевтической композиции) млекопитающему (например, человеку, имеющему болезнь Фабри).

В некоторых вариантах наборы содержат композицию, содержащую по меньшей мере один из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации, и композицию, содержащую по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, любое сочетание одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, описанных в настоящей публикации). В некоторых вариантах набор дополнительно содержит инструкции по осуществлению любого из способов, описанных в настоящей публикации.

Болезнь Фабри

Болезнь Фабри является X-сцепленной рецессивной лизосомной болезнью накопления, характеризующейся недостаточностью α -галактозидазы-А, известной как церамидтригексозидазой, которая приводит к сосудистым и другим патологическим проявлениям в результате накопления гликофинголипидов с концевыми остатками α -галактозила, таких как глоботриаозилцерамид (GL-3). Не ограничивающие симптомы болезни Фабри включают ангидроз, боль в пальцах, гипертрофию левого желудочка, почечные проявления и ишемические инсульты. Тяжесть симптомов сильно варьирует (смотри, Grewal et al., J. Neurol. 241: 153-156, 1994). Известен вариант с проявлениями, ограниченными сердцем, и он может быть более распространен, чем когда-то считалось (см. Nakao, N. Eng. J. Med. 333: 288-293, 1995). Распознавание необычных вариантов может быть отсрочено вплоть до довольно позднего периода жизни, хотя возможен диагноз в детстве при внимательном клиническом обследовании (Ko et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 120: 86-89, 1996; Mendez et al., Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 8: 252-257, 1997; Shelley et al., Pediatric Derm. 12: 215-219, 1995). Средний возраст, в котором ставят диагноз болезни Фабри, составляет 29 лет.

Способы лечения болезни Фабри, повышения уровней α -галактозидазы в лизосоме клетки млекопитающего и снижения уровня глоботриаозилцерамида у субъекта

Также в настоящем изобретении предлагаются способы лечения болезни Фабри у субъекта (например, человека), которые включают введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации. Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, описанные в настоящей публикации, опосредуют лечение болезни Фабри за счет повышения концентрации α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего у субъекта. Успешное лечение болезни Фабри у субъекта может определить медицинский работник (например, сестра, лечащий врач или фельдшер). Например, успешное лечение может приводить к снижению количества, тяжести и/или частоты одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта (например, ангидроза, боли в пальцах, гипертрофии левого желудочка, почечных проявлений, ишемических инсультов и повышенных уровней глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта) (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения). Кроме того, успешное лечение можно определить, наблюдая снижение уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке или ткани (например, в почке) субъекта с течением времени (например, по сравнению с субъектом, имеющим болезнь Фабри, получающим другое лечение, получающим плацебо или не получающим лечения или по сравнению с тем же самым субъектом до лечения). Дополнительные способы определения успешного лечения болезни Фабри у субъекта описаны в настоящей публикации и известны в данной области.

Также предлагаются способы повышения уровней белка α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего (например, клетке *in vitro* или клетке в организме млекопитающего, такого как человек), которые включают в себя осуществление контакта клетки по меньшей мере с одним из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации или по меньшей мере с одной из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации, в количестве, достаточном для повышения уровней белка α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке. Клеткой млекопитающего может быть клетка, которая экспрессирует рецептор манноза-6-фосфата. Уровни α -галактозидазы-А в лизосоме клетки млекопитающего можно определить, применяя иммунофлуоресцентную микроскопию с использованием антитела, которое специфично связывается с белком α -галактозидазы-А человека. Уровни белка α -галактозидазы-А в лизосоме клетки млекопитающего также могут быть определены пу-

тем выделения лизосом из клетки млекопитающего и определения уровней белка α -галактозидазы-А в изолированных лизосомах, например, посредством использования антитела, которое специфично связывается с белком α -галактозидазы-А или посредством осуществления анализа активности белка α -галактозидазы-А с использованием лизата изолированных лизосом. Примером анализа белка α -галактозидазы-А является анализ, в котором используют О-нитрофенил- α -D-галактозид в качестве субстрата. В таком анализе О-нитрофенил- α -D-галактозид превращается в продукты О-нитрофенол и D-галактозу. В другом примере анализа для выявления активности белка α -галактозидазы-А используют флуорогенный субстрат, α -D-галактопиранозид (Shi et al., Anal. Bioanal. Chem. 394: 1903-1909, 2009). Повышение уровня белка α -галактозидазы-А белок в лизосоме клетки у субъекта (например, у человека) можно опосредованно выявлять, наблюдая снижение количества симптомов болезни Фабри, которые испытывает субъект (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения), снижение скорости появления новых симптомов болезни Фабри, наблюдаемых у субъекта (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения), снижение тяжести одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения) или уменьшение ухудшения одного или нескольких симптомов болезни Фабри у субъекта (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения). Альтернативно или дополнительно, повышение уровня белка α -галактозидазы-А в лизосоме клетки можно, например, выявить, наблюдая снижение уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта (например, по сравнению с контрольным субъектом, имеющим такое же заболевание, но, например, не получающим лечения, получающим другое лечение или получающим плацебо, или тем же субъектом до лечения). Уровень белка α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего после лечения рекомбинантным белком, описанной в настоящей публикации, можно сравнить с уровнем α -галактозидазы-А в лизосоме не подвергаемой лечению клетки млекопитающего (например, клетки того же типа). Также предлагаются способы снижения уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке или ткани (например, в почке) субъекта (например, человека), которые включают в себя введение субъекту по меньшей мере одного из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека или по меньшей мере одной из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации. Уровень глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта можно определить, например, используя масс-спектрометрию (Kim et al., Korean J. Intern. Med. 25: 415-421, 2010) или сэндвич-анализ с использованием антител (например, анализы, описанные в публикации заявки на выдачу патента США № 2012/0178105). Уровень глоботриаозилцерамида в сыворотке или ткани субъекта после введения по меньшей мере одного рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или фармацевтической композиции, предлагаемых в настоящем изобретении, можно сравнить с уровнем глоботриаозилцерамида в сыворотке или ткани субъекта, имеющего болезнь Фабри, но не получающего лечения, или с уровнем глоботриаозилцерамида у субъекта до введения по меньшей мере одного рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или фармацевтической композиции, предлагаемых в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах у субъекта (например, человека) ранее было диагностировано или предполагается наличие болезни Фабри. В некоторых вариантах млекопитающее идентифицировано, как имеющее повышенный риск развития болезни Фабри (например, повышенный генетический риск развития болезни Фабри). Млекопитающее может быть женского или мужского пола и может быть взрослым или быть юного возраста (например, ребенок грудного возраста или начинающий ходить). В некоторых случаях субъектом является человека. В том случае, когда млекопитающее имеет юный возраст, то он или она может иметь возраст от 1 дня до 18 лет, включительно (например, возраст от 1 дня до 17 лет, возраст от 1 дня до 16 лет, возраст от 1 дня и 15 лет, возраст от 1 дня до 14 лет, возраст от 1 дня до 13 лет, возраст от 1 дня до 12 лет, возраст от 1 дня до 11 лет, возраст от 1 дня до 10 лет, возраст от 1 дня до 9 лет, возраст от 1 дня до 8 лет, возраст от 1 дня до 7 лет, возраст от 1 дня до 6 лет, возраст от 1 дня до 5 лет, возраст от 1 дня до 4 лет, возраст от 1 дня до 3 лет, возраст от 1 дня до 2 лет, возраст от 1 дня до 1 года, возраст от 1 дня до 6 месяцев, возраст от 6 месяцев до 4 лет, возраст от 1 месяца до 5 лет, возраст от 3 лет до 13 лет или возраст от 13 лет до 18 лет). В том случае, когда млекопитающее является взрослым, млекопитающее может иметь возраст, например, от 18 до 20 лет включительно, или возраст по меньшей мере или примерно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, или по меньшей мере или примерно 100 лет.

У субъекта может быть диагностировано наличие болезни Фабри медицинским работником при наблюдении одного или нескольких симптомов у субъекта (например, одного или нескольких из любых симптомов болезни Фабри, описанных в настоящей публикации или известных в данной области). В некоторых примерах субъект уже может получать лечение по поводу болезни Фабри. В других примерах

предыдущее лечение болезни Фабри было безуспешным.

Рекомбинантные белки или фармацевтические композиции, описанные в настоящей публикации, можно вводить посредством внутривенного, внутриартериального, подкожного, внутрибрюшинного введения, введения в лимфатическую систему, внутримышечного, глазного или интратекального введения. Кроме того, рекомбинантные белки и фармацевтические композиции могут быть приготовлены с использованием известных в данной области способов и/или как описано в настоящей публикации (например, могут быть приготовлены для подкожного, внутривенного, внутриартериального введения, введения в лимфатическую систему, внутримышечного, перимускулярного или интратекального введения и/или приготовлены в липосоме или наночастице).

Рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека или фармацевтические композиции, описанные в настоящей публикации, может вводить медицинский работник (например, лечащий врач, фельдшер, сестра, помощник медицинской сестры или лаборант) или ветеринар. Альтернативно или дополнительно рекомбинантный белок или фармацевтическую композицию человек может вводить самостоятельно, например, может вводить сам пациент. Введение можно осуществлять, например, в больнице, клинике или учреждении первичной медицинской помощи (например, в центре сестринского ухода) или любом их сочетании.

В некоторых вариантах млекопитающему вводят дозу от 1 мг до 400 мг любого из рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации, или любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации (например, от 1 мг до 300 мг, от 1 мг до 250 мг, от 1 мг до 200 мг, от 1 мг до 150 мг, от 1 мг до 100 мг, от 1 мг до 80 мг, от 1 мг до 70 мг, от 1 мг до 60 мг, от 1 мг до 50 мг, от 1 мг до 40 мг, от 1 мг до 30 мг, от 1 мг до 20 мг, от 1 мг до 10 мг, от 20 мг до 120 мг, от 30 мг до 90 мг или от 40 мг до 80 мг). В некоторых примерах субъекту вводят дозу рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, составляющую примерно от 0,1 мг/кг до примерно 4,0 мг/кг (например, примерно от 0,1 мг/кг до примерно 3,5 мг/кг, примерно от 0,1 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг, примерно от 0,1 мг/кг до примерно 2,5 мг/кг, примерно от 0,1 мг/кг до примерно 2,0 мг/кг, примерно от 0,1 мг/кг до примерно 1,5 мг/кг, примерно от 0,5 мг/кг до примерно 1,5 мг/кг или примерно от 0,7 мг/кг до примерно 1,3 мг/кг).

В некоторых вариантах субъекту дополнительно вводят дополнительное терапевтическое средство (например, любое из дополнительных терапевтических средств, описанных в настоящей публикации). Дополнительное терапевтическое средство можно вводить субъекту по существу в то же самое время, в которое вводят рекомбинантный белок или фармацевтическую композицию и/или в одной или нескольких других временных точках. В некоторых вариантах дополнительное терапевтическое средство готовят вместе по меньшей мере с одним рекомбинантным белком α -галактозидазы-А человека (например, с использованием любого из примеров препаратов и композиций, описанных в настоящей публикации).

В некоторых вариантах дополнительное терапевтическое средство готовят в первой лекарственной форме и по меньшей мере один рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека готовят во второй лекарственной форме. В том случае, когда дополнительное терапевтическое средство готовят в первой лекарственной форме и по меньшей мере один рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека готовят во второй лекарственной форме, первая лекарственная форма и вторая лекарственная форма могут быть приготовлены, например, для одного и того же пути введения (например, перорального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутриартериального, интратекального введения, введения в лимфатическую систему или внутрибрюшинного введения) или для разных путей введения (например, первую лекарственную форму готовят для перорального введения, а вторую лекарственную форму готовят для подкожного, внутривенного, внутриартериального или внутримышечного введения). Сочетания таких схем лечения ясно предусмотрены в настоящем изобретении.

Как описано выше, вводимое количество по меньшей мере одного рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека (и необязательно дополнительного терапевтического средства), будет зависеть от того, является ли введение местным (например, внутримышечным) или системным. В некоторых вариантах субъекту (например, человеку) вводят более одной дозы по меньшей мере одного рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или по меньшей мере одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах субъекту (например, человеку) вводят более одной дозы (например, две или больше доз) любой из композиций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах субъекту вводят дозу по меньшей мере одного рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или по меньшей мере одной фармацевтической композиции по меньшей мере один раз в месяц (например, по меньшей мере два раза в месяц, по меньшей мере три раза в месяц, по меньшей мере четыре раза в месяц, по меньшей мере один раз в неделю, по меньшей мере два раза в неделю, три раза в неделю, один раз в сутки или два раза в сутки). Например, субъекту можно вводить две или более доз любой из фармацевтических композиций или одного или нескольких рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека с частотой, составляющей по меньшей мере одну дозу каждые два месяца (например, по меньшей мере одну дозу каждый месяц, по меньшей мере одну дозу в неделю, по меньшей мере одну дозу каждые две недели или по меньшей мере одну дозу в сутки).

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека или фармацевтическую композицию можно вводить субъекту хронически. Хроническое лечение включает любую форму многократного введения в течение длительного периода времени, такую как многократные введения в течение одного или нескольких месяцев, от месяца до года, один или несколько лет, более пяти лет, более 10 лет, более 15 лет, более 20 лет, более 25 лет, более 30 лет, более 35 лет, более 40 лет, более 45 лет или дольше. Альтернативно или дополнительно, можно проводить хроническое лечение. Хроническое лечение может включать в себя регулярные введения, например, один или несколько раз в сутки, один или несколько раз в неделю или один или несколько раз в месяц. Например, хроническое лечение может включать в себя введение (например, внутривенное введение) примерно каждые две недели (например, примерно от каждых 10 до 18 суток). Подходящая доза может представлять собой количество рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, которое составляет наименьшую дозу, эффективную для получения требуемого терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных в настоящей публикации. При необходимости эффективная суточная доза рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека или фармацевтической композиции может быть введена в виде двух, трех, четырех, пяти или шести или больше частей дозы, вводимых отдельно с соответствующими интервалами на протяжении суток, необязательно, в стандартных лекарственных формах.

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека или фармацевтическая композиция могут быть приготовлены для длительного высвобождения (например, приготовлены в биологически разрушаемом полимере или наночастице) и, в некоторых случаях, могут быть введены непосредственно в мышечную ткань, подкожную ткань или брюшную полость субъекта (внутримышечное, внутрибрюшинное или введение подкожного депо соответственно). Альтернативно или дополнительно, препарат длительного высвобождения можно вводить системно (например, пероральное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное введение, введение в лимфатическую систему или подкожное введение). В некоторых случаях рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека или фармацевтическая композиция могут быть приготовлены для перорального, внутрижелудочного, околожелудочного, подкожного введения, введения в протоки, внутримышечного, перимускулярного, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, трансдермального введения, введения в лимфатическую систему или внутривенного введения.

Примеры

Изобретение далее описано на следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Пример 1. Получение линии рекомбинантных клеток для продуцирования гликопротеидов.

Проводили эксперименты для разработки линии клеток, применимой для продуцирования рекомбинантных гликопротеидов. В таких экспериментах, исходную зависимость от сыворотки линию клеток СНО (DXB11) последовательно: растили в среде для культуры ткани, которая содержит 5% фетальной сыворотки теленка в течение трех суток, растили в среде для культуры ткани, которая содержит 2,5% фетальной сыворотки теленка в течение трех суток, и растили в среде для культуры ткани, которая не содержит фетальной сыворотки теленка, в течение восьми суток. В конце такого периода культивирования полученную в результате культуру клеток СНО разбавляли и делили на аликвоты, чтобы получить не содержащие сыворотки суспензионные культуры субпопуляций или пулов. После размножения и оценки роста не содержащие сыворотки пулы делили на аликвоты, чтобы получить культуры клонов отдельных клеток. Каждый клон из отдельной клетки тестировали в отношении его клеточного роста в не содержащей сыворотки культуральной среде, и подгруппу клонов затем тестировали в отношении эффективности трансфекции посредством электропорации экспрессирующего вектора, кодирующего красный флуоресцирующий белок (RFP), под контролем промотора β -актина хомячка, при этом экспрессию RFP анализировали с использованием проточной цитометрии через 2 дня после трансфекции. Клоны, удовлетворяющие критериям времени удвоения (<35 ч) и эффективности трансфекции (>30% RFP-позитивны с >75% выживаемостью культуры), оценивали в отношении экспрессии рекомбинантного белка после стабильной трансфекции экспрессирующим вектором(ами), кодирующим представляющий интерес ген (гены) под контролем промотора β -актина хомячка и кодирующими ген DHFR под контролем промотора SV40. После трансфекции отбирали стабильно трансфицированные пулы, используя метотрексат (MTX), и после отбора пулы оценивали в отношении продуктивности рекомбинантного белка, высевая клетки в культурах без периодической подкормки и анализируя собранную осветленную среду в отношении уровней рекомбинантного белка. На основе выживаемости при селекции с использованием MTX и уровней продукции рекомбинантного белка в стабильно трансфицированных пулах идентифицировали наилучший не содержащий сыворотки родительский клон.

Наилучший родительский клон субклонировали и затем культивировали в не содержащей белка, не содержащей полученного из организма животного компонента (ADC) и химически определенной среде (среда CD DG44 из Invitrogen), и создавали банк субклонов. Проходило приблизительно 27 клеточных поколений в не содержащей ADC среде от стадии субклонирования отдельных клеток до начального банка замороженных клеток. Клоны отдельных клеток тестировали в отношении следующих параметров:

эффективности трансфекции (посредством электропорации вектора, кодирующего RFP, описанного выше), ростовых свойств клеток (в среде CD DG44 из Invitrogen) и стабильной трансформации для продуцирования рекомбинантных белков. Оценка стабильно трансфицированных пулов (с использованием среды CD CHO из Invitrogen) включала оценки селекции на MTX, пиковой плотности клеток, ростовых свойств и показателя объемной продуктивности (VPR). Продуктивность рекомбинантного белка тестировали, как описано выше.

После всех стадий культивирования, описанных выше, идентифицировали одну родительскую клональную линию клеток, как имеющую наилучшую эффективность трансфекции и наилучшую селекцию с использованием MTX, пиковые плотности клеток, ростовые свойства клеток и показатель объемной продуктивности (VPR) стабильно трансфицированных пулов. Такую родительскую линию клеток размножали и ее аликвоты замораживали для использования в будущих экспериментах.

Пример 2. Получение рекомбинантной α -галактозидазы-А человека.

Флакон с клетками, продуцирующими (и секретирующими) рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, размораживали в химически определенной и не содержащей полученных из организма животных компонентов (ADC) культуральной среде в качалочных колбах. Смесь подвергали размножению вплоть до момента, когда получали достаточное количество клеток для посева в перфузионные биореакторы. Культуре давали возможность расти вплоть до достижения целевой высокой плотности живых клеток, и в такой точке начинали контролировать плотность клеток. Непрерывную перфузию начинали через один день после инокуляции и затем постепенно увеличивали до фиксированной скорости перфузии при достижении целевой высокой плотности клеток в перфузионном биореакторе. Осветленную собранную жидкость (содержащую рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) непосредственно загружали на улавливающую колонку, используя интегрированную хроматографическую систему для непрерывного улавливания. Элюат после улавливания (содержащий рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) затем дополнительно очищали, используя смолу для анионообменной хроматографии (ANX), чтобы удалить ДНК, белок клетки-хозяина и другие примеси. ANX-элюат (содержащий рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) затем очищали, используя смолу для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. Элюат после аффинной хроматографии с использованием металла (содержащий рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека) концентрировали до целевой концентрации рекомбинантного белка α -галактозидазы-А и затем буфер заменяли на буфер для лекарственного вещества, используя мембрану для фильтрации в тангенциальном потоке. Лекарственное вещество в виде рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека затем подвергали аналитической характеристике (как описано в примерах). Затем в ходе приготовления для исследования ФК/ФД на животных (пример 5) лекарственное вещество в виде рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, готовили в виде препарата, добавляя маннит, и затем фильтровали через высокоэффективный фильтр 0,22 см².

Пример 3. Физическая характеристика рекомбинантной α -галактозидазы-А человека.

Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, полученный и очищенный, как описано в примере 2, подвергали физической характеристике с использованием различных биофизических способов и сравнивали с Fabrazyme® и Replagal®. Каждый из исследованных структурных и функциональных признаков рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека обсуждается ниже, наряду со способами, применяемыми для определения каждого структурного и функционального признака.

Размер молекул.

Размер молекул Fabrazyme®, Replagal® и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), оценивали, используя эксклюзионную хроматографию по размеру, МАЛДИ-ВП-МС и гель-электрофорез.

SEC.

Анализ эксклюзионной хроматографией по размеру (SEC) осуществляли, используя Agilent 1200 HPLC и колонку TSK-Gel G3000SWXL (Tosoh, 7,8 мм × 30 см). Инъектировали пятьдесят микролитров образца и хроматографию на колонке осуществляли с расходом 0,5 мл/мин. Элюированные белки регистрировали при 280 нм.

МАЛДИ-ВП-МС.

МАЛДИ-ВП-МС осуществляли, сначала разбавляя образцы (1:5) в 0,1% водном растворе муравьиной кислоты. БСА разбавляли до 2 мг/мл в 0,1% водном растворе муравьиной кислоты. Разбавленные образцы наносили пятнами в трех повторах на МАЛДИ-мишень из нержавеющей стали с насыщенной синапиновой кислотой в водном растворе 0,1% ТФУ, 50% ацетонитрилом в соотношении 1 мкл/1 мкл. Получали десять спектров из каждого пятна в различных местах и с варьирующей интенсивностью лазера и затем усредняли. Установки устройства перечислены в табл. 1. Спектры калибровали относительно пиков m/z одно- и двухзарядных ионов БСА. Исходные данные сглаживали, используя режим сглаживания по умолчанию при разрешении пиков 200. Значения пиков, полученных при измерении трех повторов, усредняли и определяли стандартное отклонение.

Таблица 1

Параметры устройства для анализа МАЛДИ-МС-анализа Fabrazyme

Параметр	Значение
Режим ионизации	Линейный положительный
Режим контроля	Ручной
Ускоряющее напряжение	25000 В
Напряжение на сетке	88%
Время задержки	750 нсек
Выстрелы/спектр	30
Диапазон масс	19999–90000
Пропускание низкой массы	2000

SDS-ПААГ.

Десять микрограмм каждого образца нагружали на 4-20% трис-глициновый гель (Invitrogen) в буфере для загрузки образцов с дитиотреитолом (DTT). К гелю прикладывали напряжение 150 на 1 ч 25 мин. После завершения гель красили раствором Кумасси R-250 для окрашивания в течение 30 мин. Избыток краски удаляли, используя раствор для удаления краски, в течение 30 мин.

Результаты.

Анализ с использованием эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) показывает, что Fabrazyme® элюируется раньше и с запаздывающим плечом, по сравнению с Replagal® (фиг. 6). Полученные результаты свидетельствуют о том, что Fabrazyme® является гетерогенным и может иметь более высокую молекулярную массу по сравнению с Replagal®. Спектры МАЛДИ-ВП-МС, представленные на фиг. 7А-7В, показывают, что отношение m/z основных видов молекул, наблюдаемых в Fabrazyme® и Replagal®, совместимы. Fabrazyme® также содержит вид рекомбинантной α -галактозидазы-А человека с более низкой молекулярной массой, не наблюдаемый в случае Replagal®. Спектры МАЛДИ-ВП-МС, представленные на фиг. 8, показывают, что отношение m/z основных видов, наблюдаемых в Fabrazyme® и FZ2G, совместимы. Fabrazyme® содержит вид с более низкой молекулярной массой, не наблюдаемый в спектрах МАЛДИ-ВП-МС FZ2G. Подвижности Fabrazyme® и Replagal® в SDS-ПААГ совместимы. Минорные виды с более высокой подвижностью (более низкая кажущаяся молекулярная масса) наблюдаются в Fabrazyme®, но не в Replagal® (фиг. 9).

Профиль гликозилирования.

Профили N-связанного гликозилирования для Fabrazyme®, Replagal® и FZ2G определяли, используя дериватизацию 2-антраниловой кислотой (AA) и жидкостную хроматографию с нормальными фазами и детекцией флуоресценции, как в общем описано в публикации Kamoda с соавторами (J. Chromatography A 1133: 332-339, 2006).

Анализ сайт-специфичных гликанов.

Анализ сайт-специфичного гликозилирования Fabrazyme®, Replagal® и FZ2G осуществляли, используя гибридный масс-спектрометр с линейной ловушкой ионов Orbitrap (LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific), соединенный с жидкостной хроматографической системой (nanoAcquity LC, Waters). В случае данного способа продукты ферментативного расщепления получали сначала восстанавливая 100 мкг белка дитиотреитолом, затем алкилируя иодуксусной кислотой. Затем образцы переводили в трис-Cl, pH 8,0, используя колонку Biospin30 (Bio-Rad), и затем осуществляли 18-часовое расщепление эндопротеазой Lys-C и 2-часовое расщепление трипсином. После разбавления муравьиной кислотой, чтобы погасить расщепление, 200 нг каждого образца после расщепления инъецировали на колонку C-18 размером 75 мкм × 10 см (Picofrit, New Objectives). Пептиды элюировали, используя ступенчатый градиент 2-95% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте. Сканировали m/z в диапазоне 325-1800, используя FTMS с разрешением 60000 with top 5 intensity data dependent CID scans. Данные МС интегрировали и обрабатывали, используя компьютерную программу RefinerMS V 7.6 (Genedata) для количественной оценки, и получали спектры CID для подтверждения состава гликоформ.

Результаты.

На фиг. 10 показана типичная хроматограмма AA-дериватизованных N-связанных олигосахаридов Fabrazyme®, на которой показан конкретный тип N-связанного олигосахарида, присутствующего в каждом из пиков. Идентификационную информацию о видах гликанов, наблюдаемых в профилях AA-меченых гликанов, определяли в ЖХ=МС-анализе. Хроматограммы, показывающие элюирование разных типов AA-дериватизованных N-связанных олигосахаридов в Fabrazyme® и Replagal®, показаны на фиг. 11. Процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которое соответствует каждому типу N-связанных олигосахаридов в случае Fabrazyme® и Replagal®, показаны на фиг. 12. Относительное процентное содержание гликанов каждого вида, наблюдаемых у Asn108, Asn161 и Asn184 в Fabrazyme® и Replagal®, показано на фиг. 13, 14 и 15 соответственно. Относительное процентное содержание

гликанов каждого вида, наблюдаемых у Asn108, Asn161 и Asn184 Fabrazyme® и FZ2G, показано на фиг. 16 и 17, 18 и 19 соответственно.

АА-меченые профили Fabrazyme® и FZ2G показаны на фиг. 20. Процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые соответствуют нейтрально заряженным олигосахаридам (пик 1), моносиалилированным содержащим фукозу олигосахаридам (пик 2) и моносиалилированным олигосахаридам (пик 3) в Fabrazyme® и FZ2G, показаны на фиг. 21А-С. Процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые соответствуют бисалилированным содержащим фукозу олигосахаридам (пик 4), бисалилированным олигосахаридам (пик 5) и трехантенным, трисиалилированным олигосахаридам формы 1 (пик 6) в Fabrazyme® и в FZ2G, показаны на фиг. 22А-С. Процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые соответствуют трехантенным, трисиалилированным олигосахаридам формы 2 (пик 6'), манноза-6-фосфат-олигосахаридам (пик 7) и монофосфорилированным олигосахаридам (пик 8) в Fabrazyme® и в FZ2G, показаны на фиг. 23А-С. Процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые соответствуют тетрасалилированным олигосахаридам (пик 9), моносиалилированным или монофосфорилированным олигосахаридам (пик 10) и бис-манноза-6-фосфат-олигосахаридам (пик 11) в Fabrazyme® и in FZ2G, показаны на фиг. 24А-С.

Полученные данные показывают, что предлагаемый в настоящем изобретении рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека (FZ2G) имеет значительно отличающуюся картину гликозилирования по сравнению с Fabrazyme®. Например, рекомбинантные белки α -галактозидазы-А человека, предлагаемые в настоящем изобретении (FZ2G) имеют процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды (пик 1), которое меньше, чем в Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные содержащие фукозу олигосахариды (пик 2), которое меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды (пик 7), которое является примерно таким же или меньше, чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды (пик 8), которое больше чем в случае Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасалилированные олигосахариды (пик 9), которое больше, чем в Fabrazyme®; процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные (пик 10), которое больше чем в Fabrazyme®; и процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды (пик 11), которое больше чем в Fabrazyme®. Измененная картина гликозилирования рекомбинантных белков α -галактозидазы-А человека, описанных в настоящей публикации (FZ2G) (например, по сравнению с Fabrazyme®) обеспечивает несколько преимуществ, например, одно или несколько из следующих преимуществ: снижение неспецифичного таргетинга рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека в печень (на основании пониженного связывания с рецептором асиалогликопротеида, экспрессированным на поверхности гепатоцитов после введения рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека субъекту, например, человеку), повышенная скорость эндоцитоза рекомбинантного белка α -галактозидазы человека клеткой млекопитающего (например, клеткой человека), экспрессирующей белок рецептора манноза-6-фосфата на своей поверхности, повышенная аффинность к белку рецептора манноза-6-фосфата и увеличенное время полужизни в сыворотке по сравнению с Fabrazyme®.

Соотношения манноза-6-фосфата и N-ацетилнейраминовой кислоты к белку.

Проводили дополнительный набор экспериментов, чтобы определить молярное соотношение манноза-6-фосфата к белку и молярное соотношение N-ацетилнейраминовой кислоты к белку в рекомбинантном белке α -галактозидазы-А человека, предлагаемом в настоящем изобретении (FZ2G), и в Fabrazyme®.

Данные показывают, что рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G) имеет молярное соотношение манноза-6-фосфата к белку, которое является примерно таким же, как в Fabrazyme®, и увеличенное молярное соотношение N-ацетилнейраминовой кислоты к белку по сравнению с Fabrazyme® (фиг. 25А-В).

Изоэлектрическая точка.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией (icIEF) использовали для оценки заряда белка в случае каждого тестируемого белка. Электрофореграммы Fabrazyme® и Replagal® показаны на фиг. 31. Относительные доли в процентах диапазонов низких, средних и высоких значений pI на электрофореграмме, определенные для рекомбинантного белка α -галактозидазы-А, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), и для Fabrazyme®, показаны на фиг. 32А-С.

Обращенно-фазовая хроматография.

В другой группе экспериментов Fabrazyme® и Replagal® анализировали, используя обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ-ВЭЖХ). Образцы инъецировали на ко-

лонку YMC Octyl (Waters, 2,0 × 100 мм) и элюировали, используя линейный градиент ТФУ/ацетонитрил с расходом 0,25 мл/мин. Элюированные белки выявляли при 215 нм. Анализы осуществляли, используя Agilent 1200 HPLC.

Данные показывают, что Replagal® элюируется с колонки для ОФ-ВЭЖХ в более ранней временной точке, чем Fabrazyme® (фиг. 35).

Пример 4. Функциональная характеристика рекомбинантной α -галактозидазы-А человека.

Активность в связывании катион-независимого рецептора манноза-6-фосфата.

Проводили серию экспериментов Biacore для тестирования способности рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении, Fabrazyme® и Replagal® связываться с катион-независимым рецептором манноза-6-фосфата (CIMPR).

Сенсограммы Biacore для Fabrazyme® и Replagal® показаны на фиг. 26. Кривые связывания, полученные на основе таких сенсограмм для Fabrazyme® и Replagal®, показаны на фиг. 27. График, суммирующий активность в связывании CIMPR рекомбинантного белка α -галактозидазы-А, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), и Fabrazyme®, показан на фиг. 28. Сравнение полученных данных показывает, что рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), имеет повышенную активность в связывании CIMPR по сравнению с Fabrazyme®.

Способность рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), Fabrazyme® и Replagal® связываться с рецептором манноза-6-фосфата также тестировали, используя хроматографию на аффинной колонке. Колонки с рецептором манноза-6-фосфата ступенчато элюировали манноза-6-фосфатом, и процентное содержание общего нагруженного рекомбинантного белка, элюирующегося с колонки в каждой элюируемой фракции, показано на фиг. 29 и 30). Данные свидетельствуют, что рекомбинантный белок α -галактозидазы-А, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), имеет более низкое относительное процентное содержание несвязанных и более высокое процентное содержание высокоаффинных видов, по сравнению с Fabrazyme® и Replagal®.

K_m и V_{max} .

Также определяли значения K_m и V_{max} рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), и Fabrazyme®.

Данные показывают, что рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), имеет более низкое или примерно такое же значение K_m по сравнению с Fabrazyme® (фиг. 33) и имеет примерно такое же или немного пониженное значение V_{max} по сравнению с Fabrazyme® (фиг. 34).

В сумме, данные, представленные в настоящем описании, показывают, что рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), имеет измененную картину гликозилирования и улучшенную активность в связывании рецептора манноза-6-фосфата по сравнению с Fabrazyme®.

Пример 5. Исследования на животных.

Проводили два исследования на животных моделях, чтобы оценить влияние рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении, на клиренс GL-3 и фармакокинетические параметры.

Первое исследование проводили для того, чтобы исследовать влияние рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека (по сравнению с Fabrazyme®) на тканевой клиренс GL-3 после однократного внутривенного (в/в) введения в дозе 0,1 мг/кг и 1 мг/кг у мышей Фабри. В данном исследовании 90 мышей с болезнью Фабри (46 самцов/44 самки) делили на 5 групп (см. табл. 2 ниже). Животным в группе 1 (n=10, 6 самцов/4 самки) однократно внутривенно вводили наполнитель. Животным в группах 2 и 3 (n=20 на группу, 10 самцов/10 самок) однократно в/в вводили Fabrazyme® в дозе 0,1 мг/кг и 1,0 мг/кг соответственно. Животным в группах 4 и 5 (n=20 на группу, 10 самцов/10 самок) однократно в/в вводили рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), в дозе 0,1 мг/кг и 1,0 мг/кг соответственно. Животное дикого типа в группе 6 (n=1 самец) не получало обработки и служило в качестве контроля для калибровки GL-3. Животных подвергали эвтаназии через 3 суток после введения дозы (группы 2-5, n=10, 5 самцов/5 самок на группу) и через 14 суток после введения дозы (группа 1 и группы 2-5, n=10, 5 самцов/5 самок на группу). Анализ GL-3 проводили на следующих тканях: сердце и почка (группы 1, 3 и 5) и селезенка и печень (группы 1, 2 и 4).

Дизайн исследования клиренса GL-3.

Таблица 2

Группа	Линия мышей	Количество животных самцы/самки	Тестируемый образец	Доза (мг/кг)	Схема дозирования/ путь дозирования	Временная точка взятия образца крови и анализ	Временная точка взятия образца ткани и анализ
1	Фабри	(10) 6/4	Наполнитель	-	Однократная доза/ внутривенно	День 2 (группы 2-5), n=10, 5 самцов/5 самок на группу) для анализа Lyso GL-3	День 3 (группы 2-5), n=10, 5 самцов/5 самок на группу) для анализа GL-3 и Lyso GL-3
2		(20) 10/10	Fabrazyme®	0,1			
3		(20) 10/10	Fabrazyme®	1,0			
4		(20) 10/10	Fz2G	0,1			
5		(20) 10/10	Fz2G	1,0			
6	SV129	(1) 1/0	не анализировали			День 13 (группы 1,6 и группы 2-2-5), n=10, 5 самцов/5 самок на группу) для анализа Lyso GL-3	День 14 (группы 1,6 и группы 2-2-5), n=10, 5 самцов/5 самок на группу) для анализа GL-3 и Lyso GL-3

Краткое обобщение некоторых функциональных и структурных характеристик рекомбинантного белка α -галактозидазы-А, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), который вводили мышам с болезнью Фабри в исследованиях на животных, описанных в данном примере, представлены в табл. 3 ниже.

Данные показывают, что сходное снижение накопления GL-3 в печени, селезенке, сердце и почке в мышинной модели болезни Фабри достигается после внутривенного введения одной дозы Fabrazyme® или одной дозы рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G) (см. фиг. 36, 37, 38 и 39 соответственно). Суммарно полученные данные показывают, что нет статистически значимого различия в клиренсе GL-3 в мышинной модели болезни Фабри после однократно внутривенно введенной дозы Fabrazyme® или однократной внутривенно введенной дозы рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G).

Таблица 3

Подгруппа физических и структурных характеристик FZ2G,
используемого в исследованиях на животных

	Fabrazyme®	FZ2G
Связывание с M6Pr (%)	100	130
icIEF		
Пики 1-5 (%)	51,3*	60,4
Пики 6-11 (%)	36,8*	28,9
Пики 12-14 (%)	11,9*	10,7
МАЛДИ-ВП-МС (m/z)	50,828	50,743
Содержание M6P (моль/ммоль)	1,7	2,0
Содержание сиаловой кислоты (моль/моль)	2,8	3,1

Второе исследование проводили для того, чтобы охарактеризовать и сравнить фармакокинетические параметры Fabrazyme® и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), у мышей Фабри после однократного введения 1 мг/кг (в/в). В данном исследовании 20 мышей Фабри (12 самцов/8 самок) делили на 2 группы (см. таблицу 4 ниже). Животным в группах 1 и 2 (n=10 на группу, 6 самцов/4 самки) однократно внутривенно вводили Fabrazyme® и рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека, предлагаемый в настоящем изобретении (FZ2G), в дозе 1,0 мг/кг соответственно. Образцы крови брали через 2, 15, 30, 60, 120, 240 и 480 мин после введения дозы для анализа фермента на высушенных пятнах крови. Фармакокинетические анализы проводили, используя Phoenix WinNonlin® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

Дизайн исследования фармакокинетики.

Таблица 4

Группа	Количество животных (самцов/ самок)	Тестируемый образец	Доза (мг/кг)	Схема дозирования	Сбор и анализ образцов
1	10 (6/4)	Fabrazyme®	1	Одна доза/ внутривенно	Образцы крови собирали через 2, 15, 30, 60, 120, 240 и 480 минут после введения дозы для анализа фермента на высушенных пятнах крови (DBS)
2	10 (6/4)	Fabrazyme второго поколения (Fz2G)	1		

Данные показывают, что фармакокинетика Fabrazyme® и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G) в анализируемых временных точках (фиг. 40) сходны. Так как образцы собирали в виде высушенных пятен крови, вычисляли ферментативную активность, а не концентрацию, в каждой временной точке. Суммарно, полученные данные показывают сходную ферментативную активность у ферментов после однократного внутривенного введения Fabrazyme® и рекомбинантного белка α -галактозидазы-А человека, предлагаемого в настоящем изобретении (FZ2G), в анализируемых временных точках.

Другие варианты

Следует понимать, что хотя изобретение описано с использованием его подробного описания, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок α -галактозидазы-А человека (rhAGA), содержащий SEQ ID NO: 3 и имеющий процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой бис-манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет более чем 9%.

2. Белок rhAGA по п.1, дополнительно имеющий процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые являются моносиалилированными олигосахаридами, которое составляет от 0,1 до 1,5%.

3. Белок rhAGA по п.2, дополнительно имеющий одно или более из:
процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой би-сиалилированные содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет более чем 13,5%;
процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 2, которое составляет более чем 2,0%; и
соотношение моль/моль сиаловая кислота/белок, которое составляет более чем 3,0.

4. Белок rhAGA по п.3, дополнительно имеющий одно или более из:
процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой нейтрально заряженные олигосахариды, которое составляет от 0,1 до 3,9%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные, содержащие фукозу олигосахариды, которое составляет от 0,1 до 3,0%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой би-сиалилированные олигосахариды, которое составляет от 0,1 до 5,3%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой трисиалилированные олигосахариды формы 1, которое составляет от 0,1 до 9,0%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой манноза-6-фосфат-олигосахариды, которое составляет от 1 до 7,0%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем 14,8%;

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой тетрасиалилированные олигосахариды, которое составляет более чем 4,9%; и

процентное содержание суммарных N-связанных олигосахаридов, которые представляют собой моносиалилированные и монофосфорилированные олигосахариды, которое составляет более чем 8,2%.

5. Фармацевтическая композиция, используемая для лечения болезни Фабри, содержащая белок rhAGA по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, приготовленная для внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интрадермального, подкожного или внутрибрюшинного введения.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, содержащая концентрацию rhAGA от 4 до 6 мг/мл.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, содержащая концентрацию rhAGA 5 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по п.5, представляющая собой стерильный, лиофилизированный порошок.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, где фармацевтически приемлемым носителем является одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из маннита, моногидрата одноосновного фосфата натрия и гептагидрата двухосновного фосфата натрия.

11. Способ лечения болезни Фабри у субъекта, включающий в себя введение субъекту, имеющему болезнь Фабри, терапевтически эффективного количества белка rhAGA по п.1.

12. Способ повышения уровня белка α -галактозидазы-А в лизосоме в клетке млекопитающего у субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества rhAGA по п.1.

13. Способ снижения уровня глоботриаозилцерамида в сыворотке субъекта, включающий в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком введении, терапевтически эффективного количества белка rhAGA по п.1.

Лизосомные болезни накопления и ассоциированные дефекты ферментов

Заболевание	Дефект фермента
Болезнь Помпе	Кислая α -глюкозидаза (например, Myozyme®, Lumizyme®)
MPSI* (болезнь Гурлера)	α -L-идуронидаза (например, Aldurazyme®)
MPSII (болезнь Хантера)	Идуронатсульфатаз
MPSIII (болезнь Санфиллипо)	гепаран-N-сульфатаза
MPSIV (болезнь Моркио А)	галактоза-6-сульфатаза
MPSIV (болезнь Моркио В)	кислая β -галактозидаза
MPSVII (болезнь Слая)	β -глюкоронидаза
Болезнь I-клеток	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза
Болезнь Шиндлера	α -N-ацетилгалактозаминидаза (α -галактозидаза В)
Болезнь Волмана	кислая липаза
Болезнь накопления сложного эфира холестерина	кислая липаза
Болезнь Фарбера	лизосомная кислая церамидаза
Болезнь Ниманна-Пика	кислая сфингомиелиназа
Болезнь Гаучера	β -глюкозидаза (например, Cerezyme®, Ceredase®)
Болезнь Краббе	галактозилцерамидаза
Болезнь Фабри	α -галактозидаза А
Ганглиозидоз GM1	кислая β -галактозидаза
Галактосиалидоз	β -галактозидаза и нейраминидаза
Болезнь Тея-Сакса	гексозаминидаза А
Болезнь Сандхоффа	гексозаминидаза А и В

*MPS – мукополисахаридоз

Фиг. 1

Белок и кДНК предшественника альфа-галактозидазы-А человека (SEQ ID NO: 1 и 2)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Фиг. 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Фиг. 2 (продолжение)

```

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

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

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

```

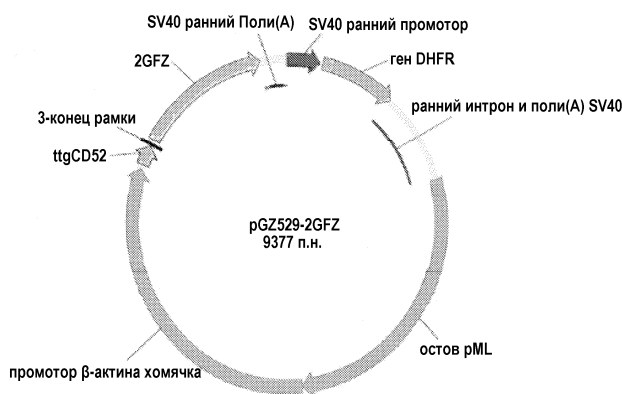
Зрелая альфа-галактозидаза-А человека (SEQ ID NO:3)

```

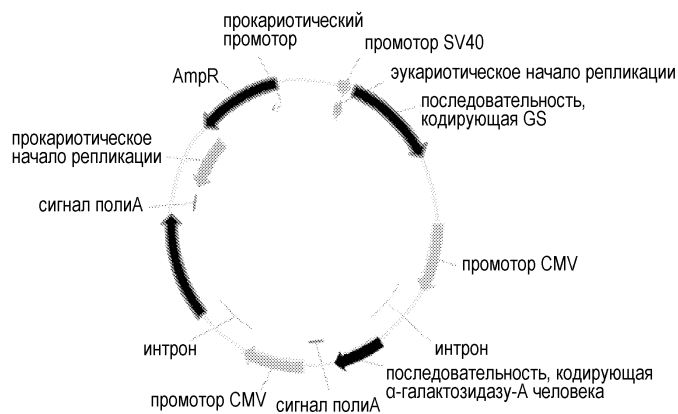
Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp 16
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys 32
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu 48
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp 64
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly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

```

Фиг. 2 (продолжение)

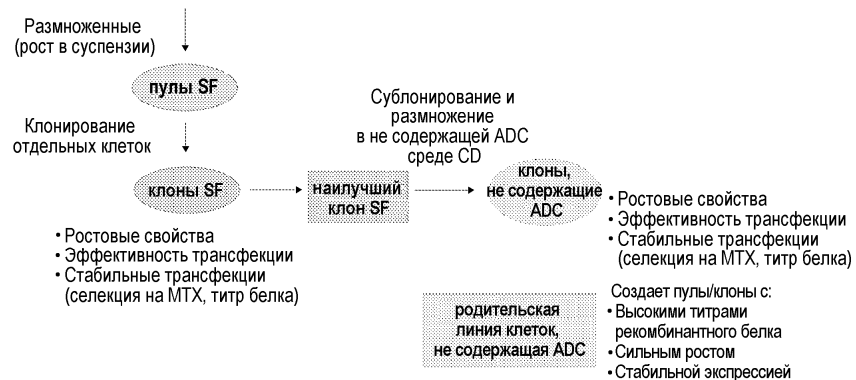


Фиг. 3

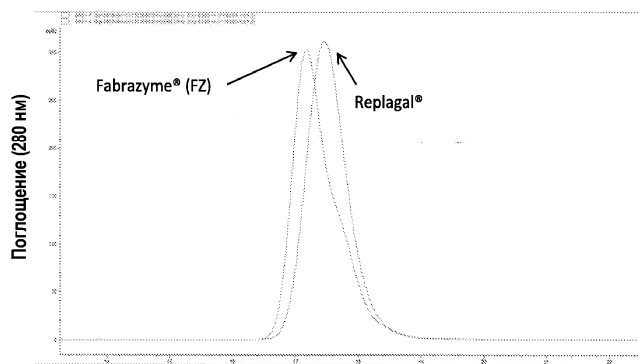


Фиг. 4

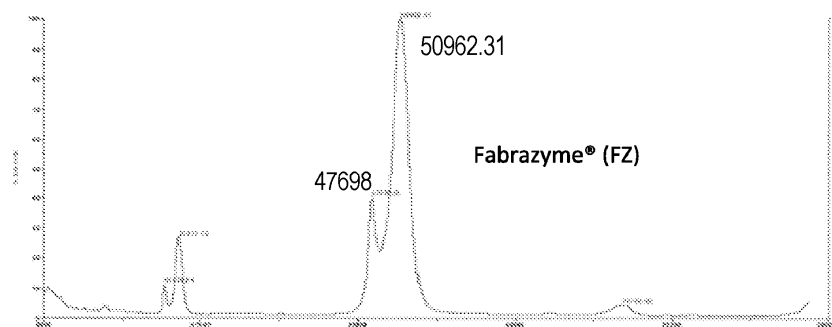
Прямая адаптация к отсутствию сыворотки (SF)



Фиг. 5

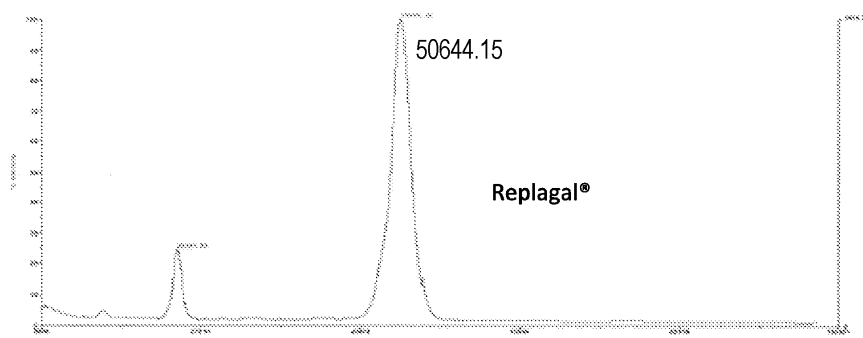


Фиг. 6

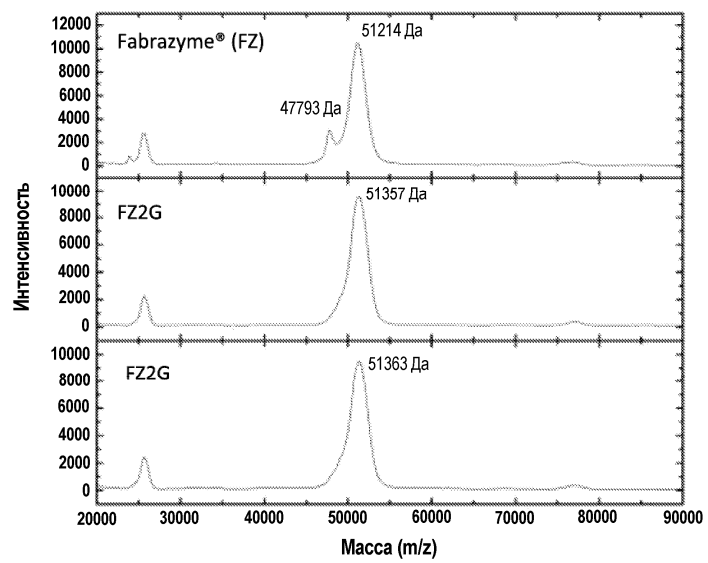


Фиг. 7А

034515



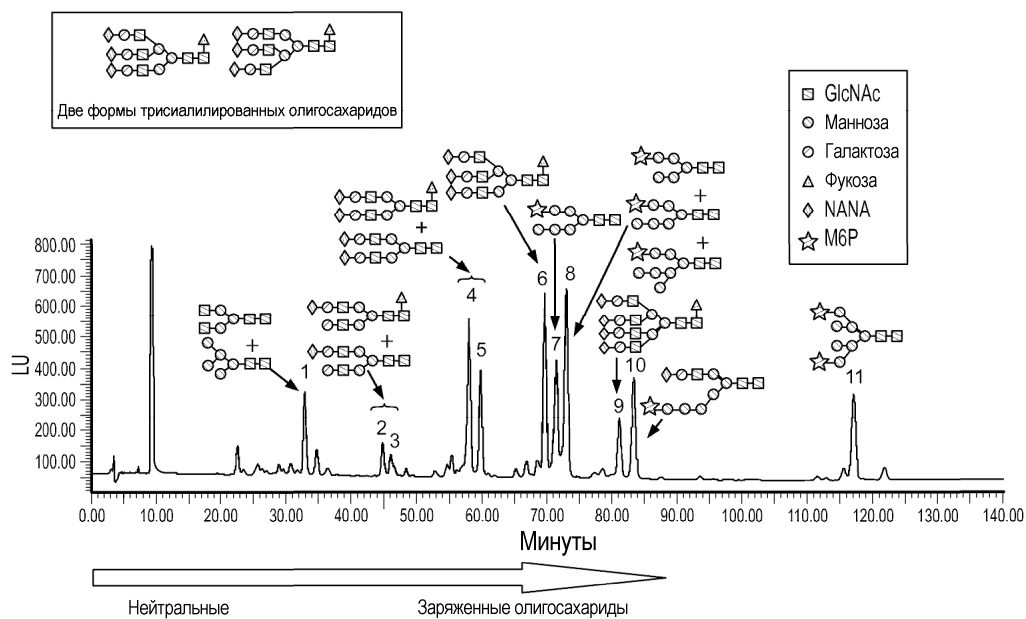
Фиг. 7В



Фиг. 8

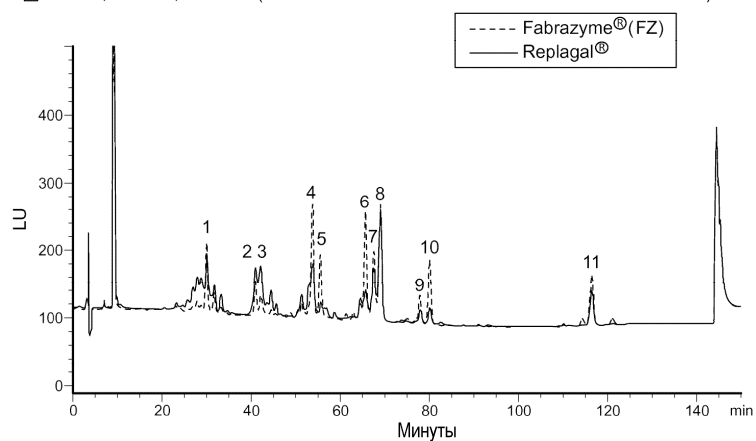


Фиг. 9

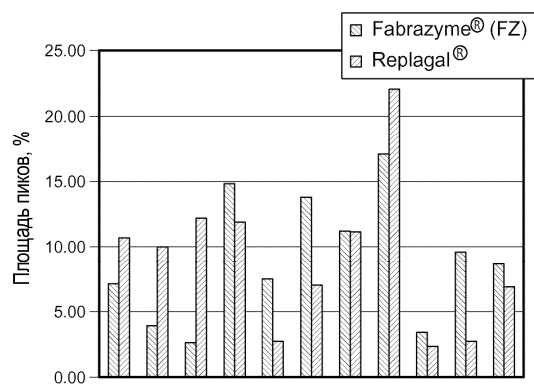


Фиг. 10

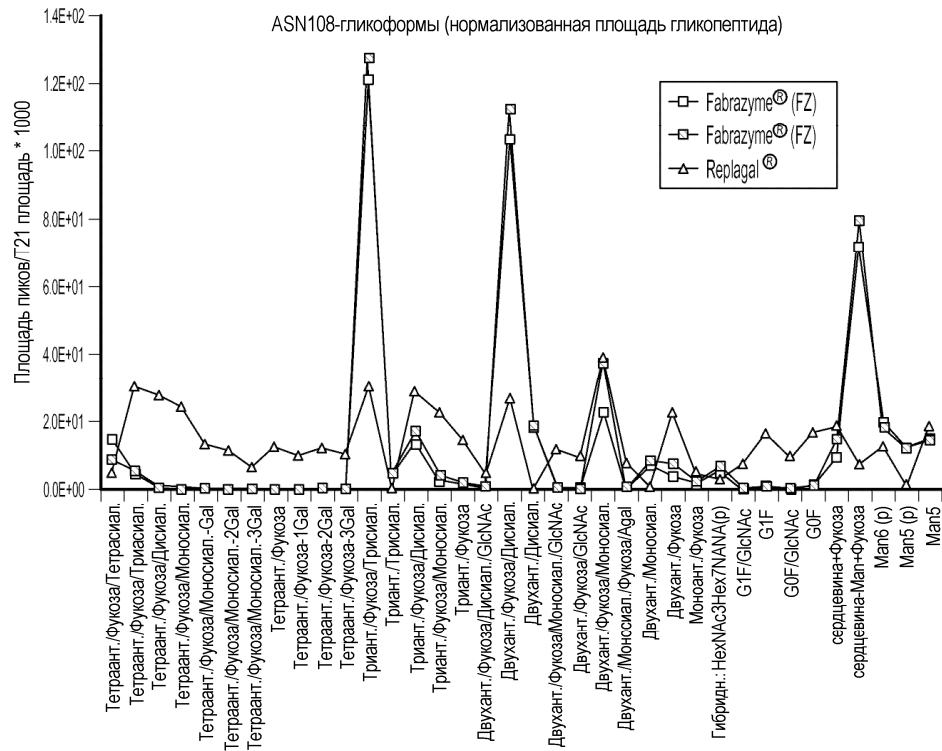
□ FLD1 A, Ex=230, Em=425 (CT040312\CT040312 2012-04-0316-39-32\002-0201.D)
 □ FLD1 A, Ex=230, Em=425 (CT040312\CT040312 2012-04-0316-39-32\003-0301.D)



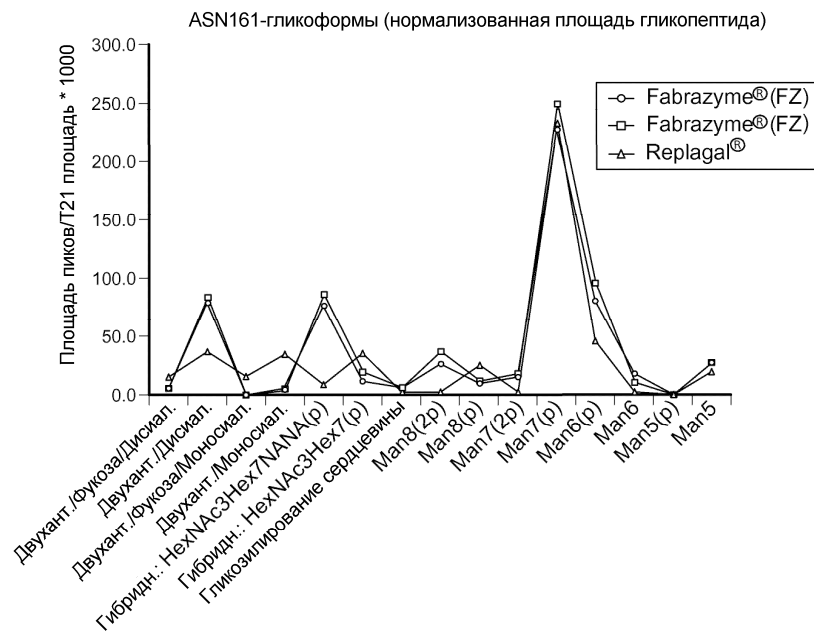
Фиг. 11



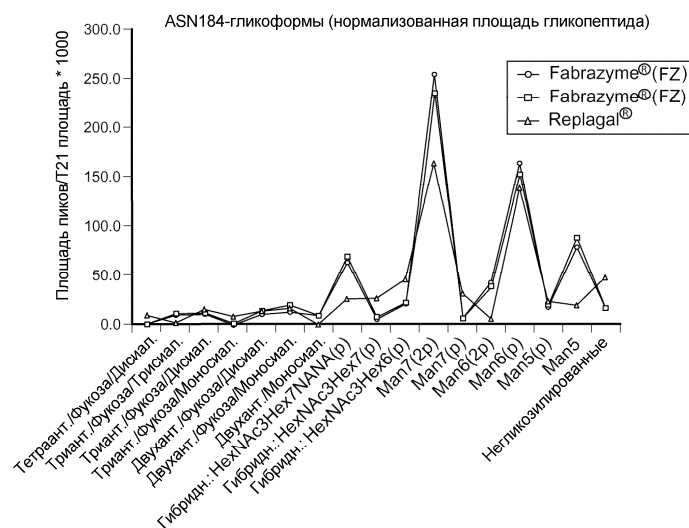
Фиг. 12



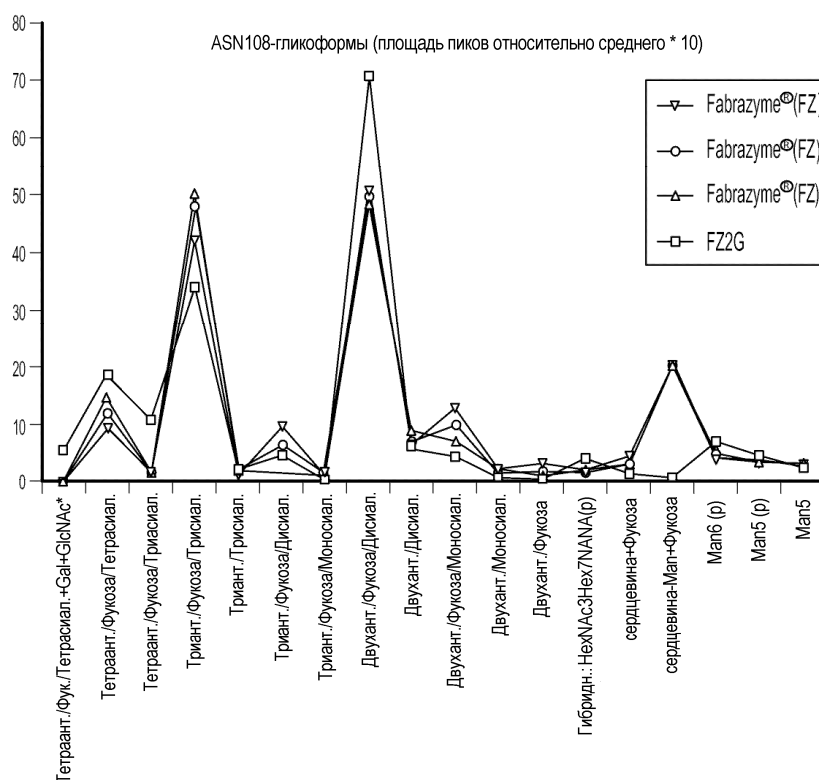
Фиг. 13



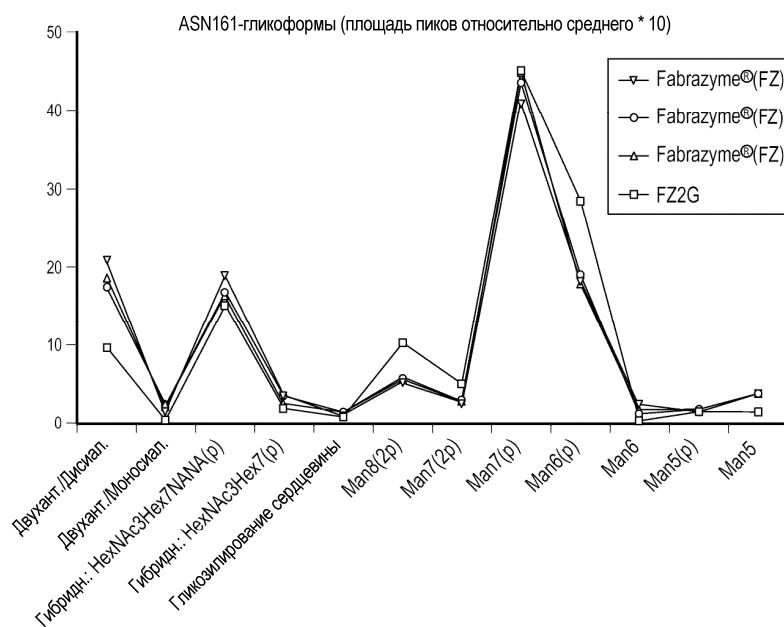
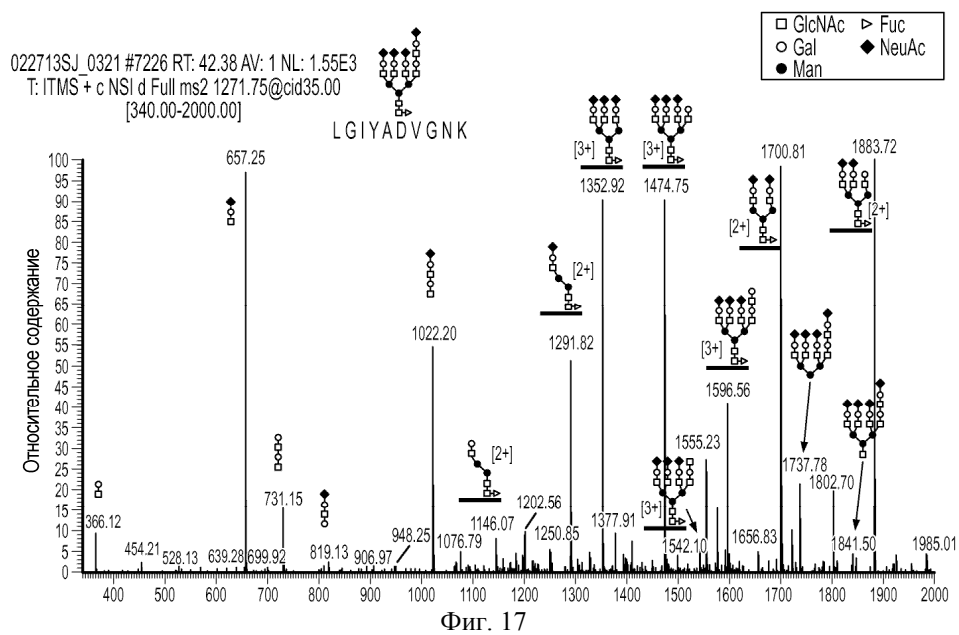
Фиг. 14

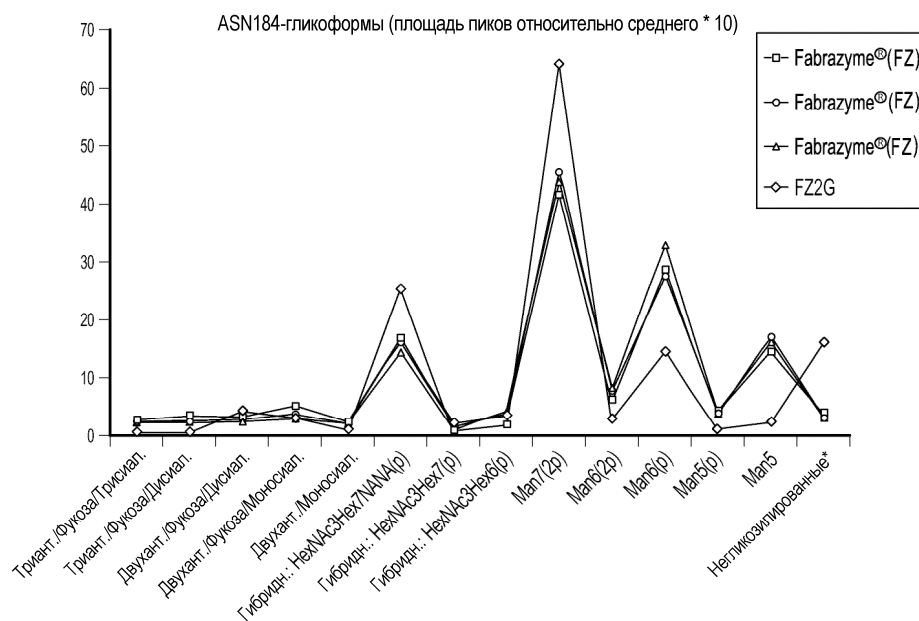


Фиг. 15

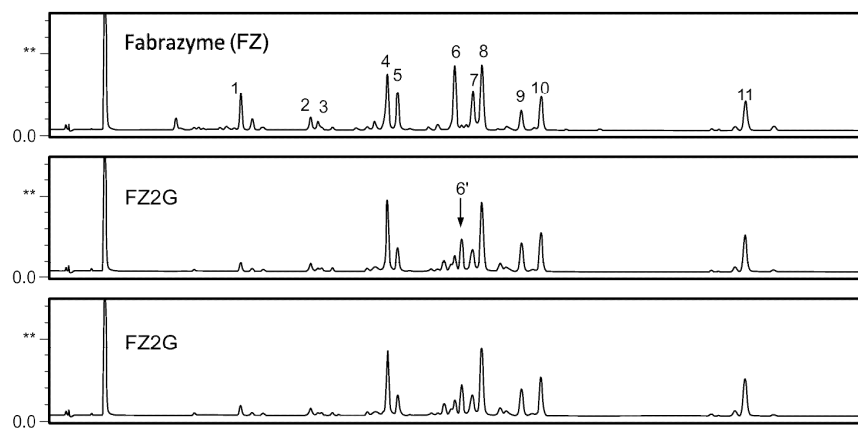


Фиг. 16

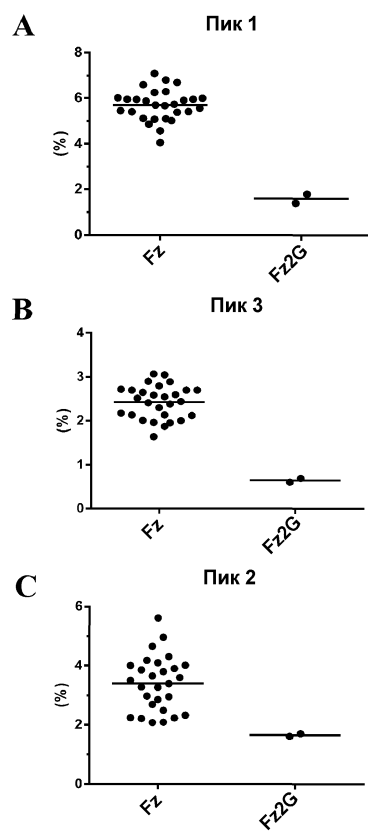




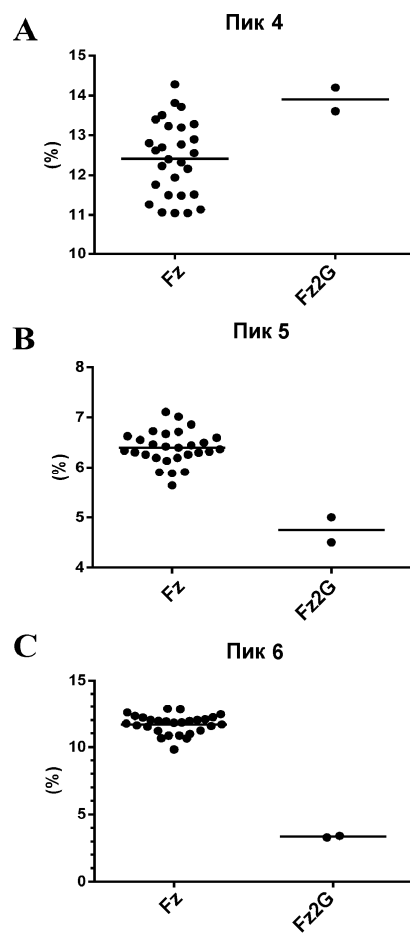
Фиг. 19



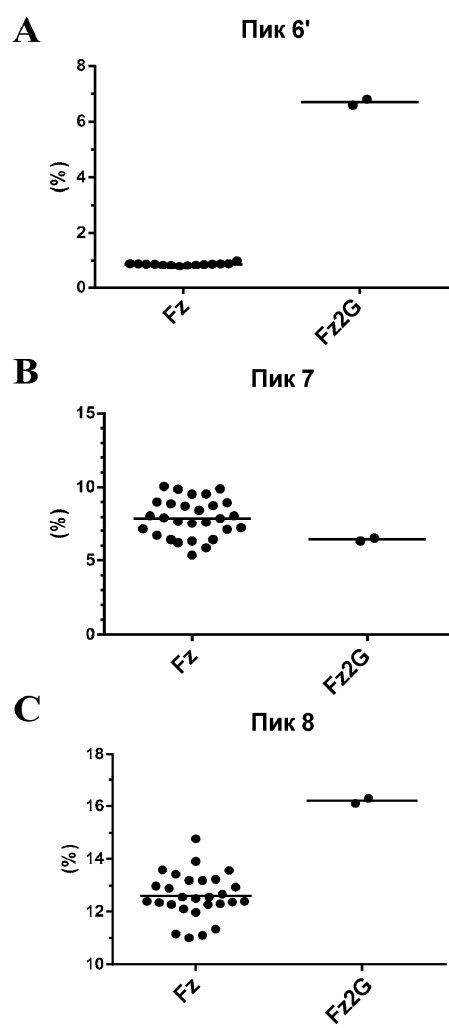
Фиг. 20



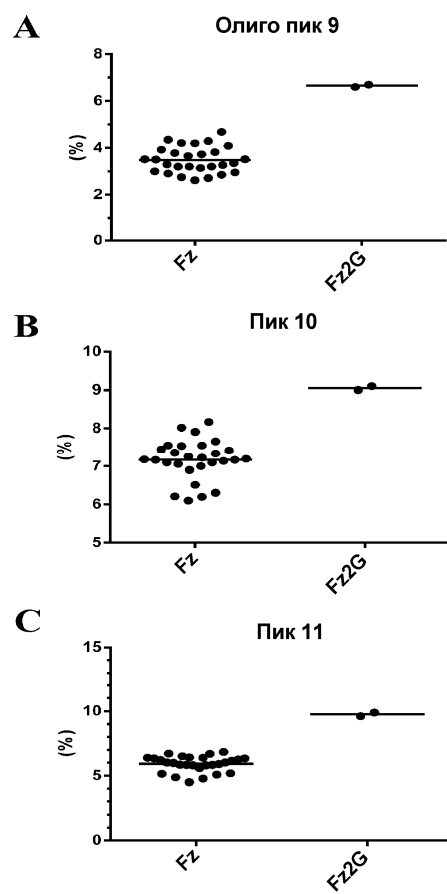
Фиг. 21



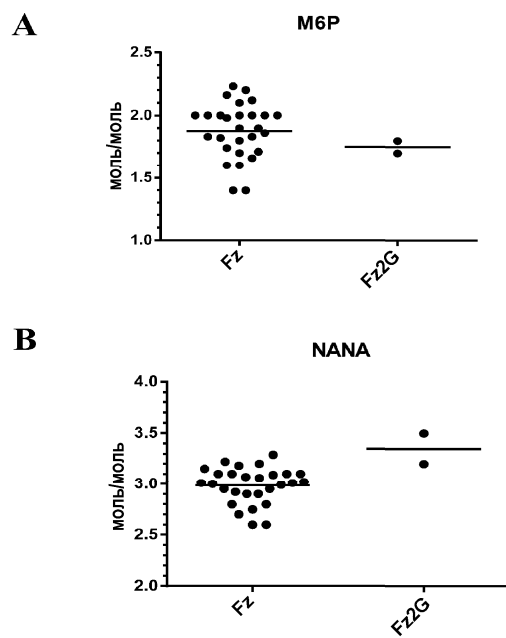
Фиг. 22



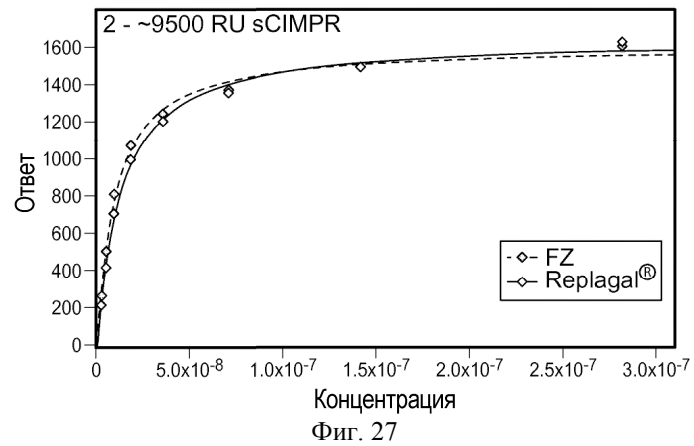
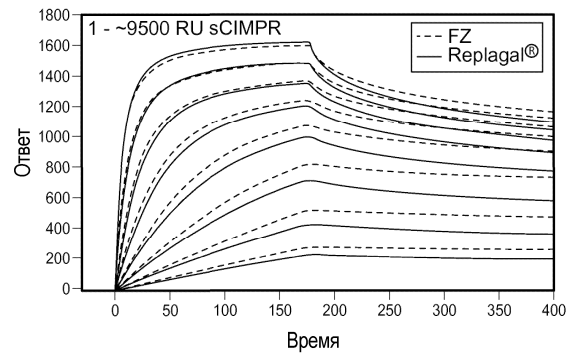
Фиг. 23



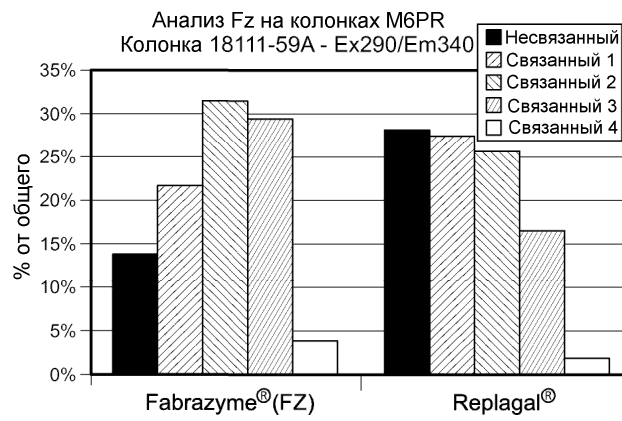
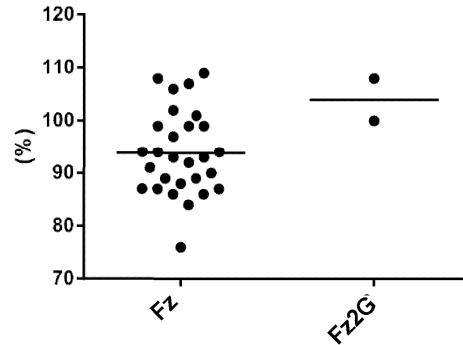
Фиг. 24

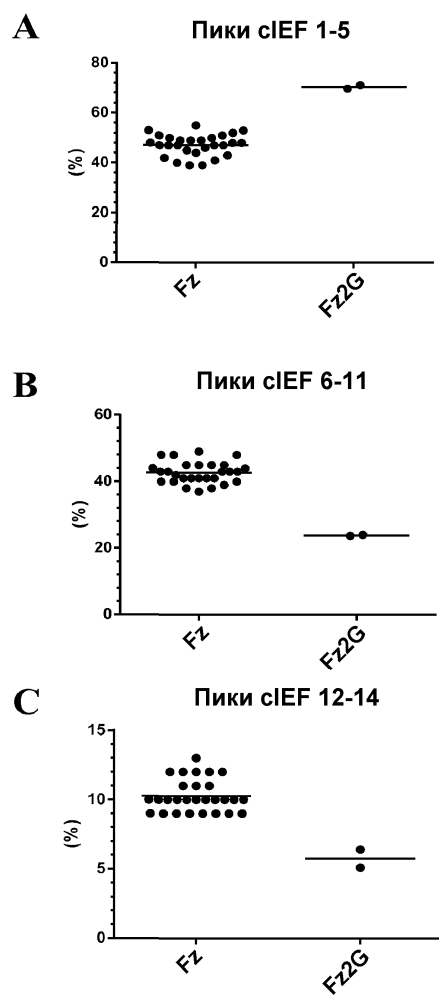
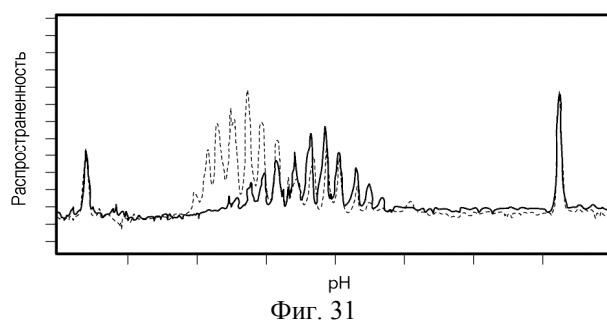
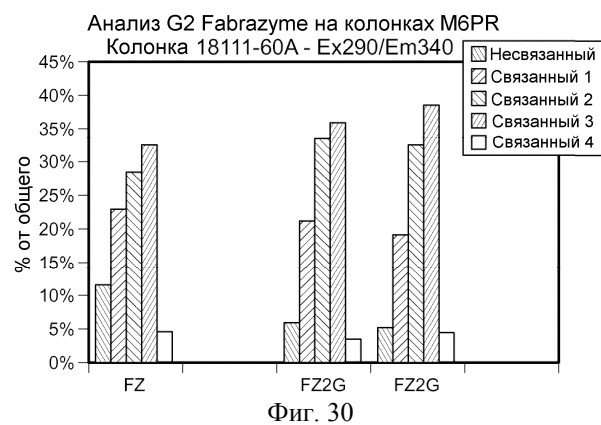


Фиг. 25

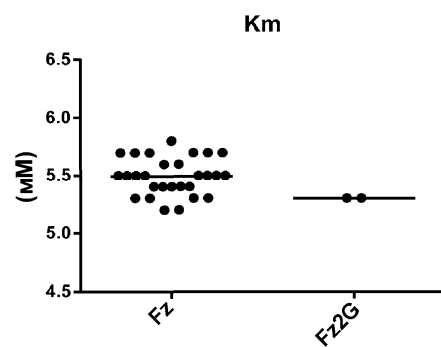


Biacore

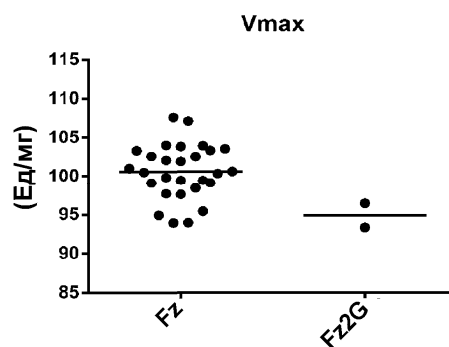




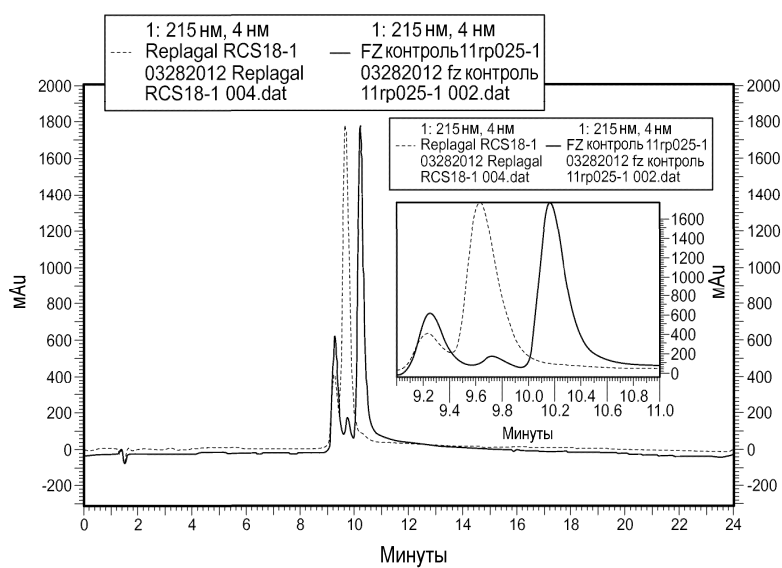
034515



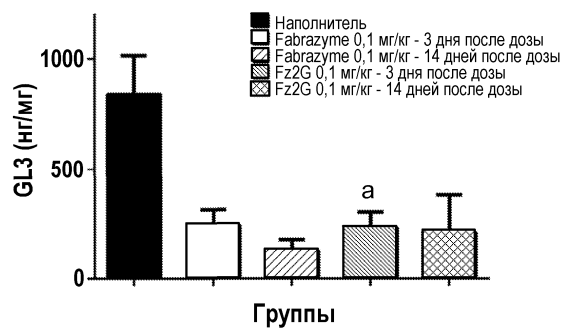
Фиг. 33



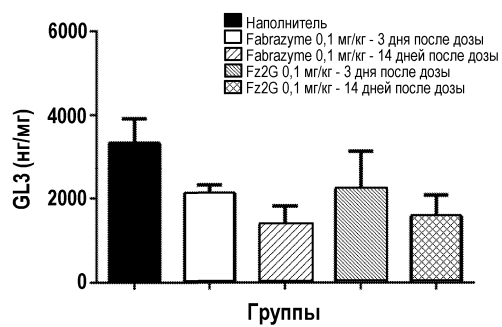
Фиг. 34



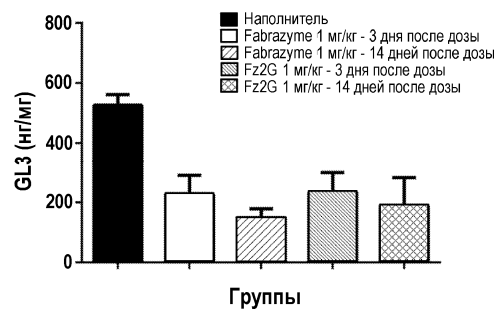
Фиг. 35



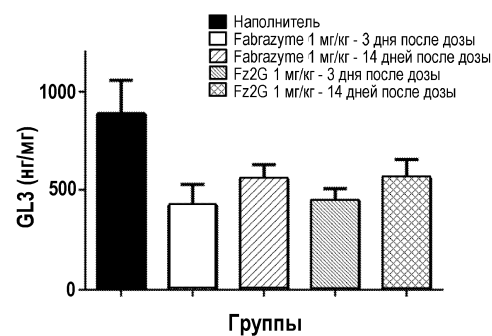
Фиг. 36



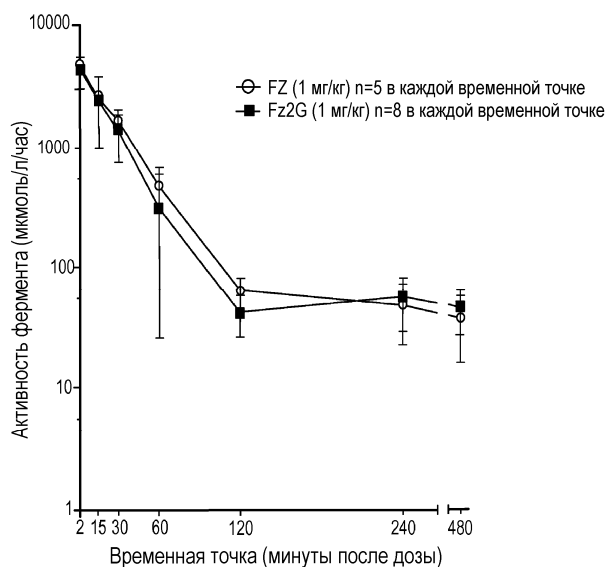
Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40

