

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034549**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.02.19**

(21) Номер заявки  
**201492177**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.06.28**

(51) Int. Cl. **C07K 1/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

---

(54) **ОЧИСТКА ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ**

---

(31) **61/666,733**

(32) **2012.06.29**

(33) **US**

(43) **2015.06.30**

(86) **PCT/US2013/048561**

(87) **WO 2014/005014 2014.01.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК  
ТЕРАПИС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Николс Дэйв (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **US-B2-8128925**  
**WO-A1-2011044542**  
**US-B2-7323553**  
**US-B2-7541164**  
**US-A-6096555**

---

(57) В изобретении, среди прочего, предложены усовершенствованные способы очистки белка I2S, полученного рекомбинантным способом, для ферментозаместительной терапии. Изобретение частично основано на неожиданном открытии, что рекомбинантный белок I2S может быть очищен от необработанного биологического материала, такого как содержащая I2S клеточная культуральная среда, при помощи способа, включающего применение всего лишь четырех хроматографических колонок.

---

**B1**

**034549**

**034549**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 61/666733, поданной на регистрацию 29 июня 2012 г.; которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Изобретение ссылается на Перечень последовательностей, поданный в электронной форме в виде файла ASCII.txt под названием "2006685-0342\_SEQ\_LIST" 27 июня 2013 г. Файл.txt был создан 25 июня 2013 г., его размер составляет 15 кБ. Полное содержание Перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

### **Уровень техники**

Мукополисахаридоз II типа (МПС II, синдром Хантера) - это сцепленное с X-хромосомой рецессивное заболевание из группы лизосомных болезней накопления, причиной которого является дефицит фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S). I2S отщепляет терминальные 2-О-сульфатные компоненты от глюкозаминогликанов (GAG) дерматансульфата и гепарансульфата. Вследствие отсутствия или дефективности фермента I2S у пациентов с синдромом Хантера GAG постепенно накапливается в лизосомах разных типов клеток, что приводит к клеточному переполнению, органомегалии, разрушению тканей и систематической дисфункции органов.

Обычно физические проявления синдрома Хантера у людей включают как соматические, так и нейрональные симптомы. Например, в некоторых случаях синдрома Хантера поражение центральной нервной системы приводит к задержке в развитии и проблемам нервной системы. Хотя при рождении симптомы синдрома Хантера, не связанные с нервной системой, обычно отсутствуют, со временем постоянное накопление GAG в клетках тела может оказывать сильное влияние на периферические ткани тела. Накопление GAG в периферической ткани приводит к характерной грубости черт лица пациента и обуславливает выдающийся лоб, уплощенную переносицу и увеличенный язык - отличительные признаки пациента с синдромом Хантера. Аналогично, накопление GAG может оказывать негативное воздействие на системы органов тела. Изначально проявляясь в виде утолщения стенок сердца, легких и дыхательных путей, а также патологического увеличения печени, селезенки и почек, эти кардинальные изменения могут, в конечном счете, привести к общей катастрофической органной недостаточности. Как следствие, синдром Хантера всегда является тяжелым, прогрессирующим и ограничивающим время жизни заболеванием.

Ферментозаместительная терапия (ФЗТ) является одобренной терапией для лечения синдрома Хантера (МПС II), которая включает введение экзогенного заместительного фермента I2S пациентам с синдромом Хантера.

### **Сущность изобретения**

В изобретении, среди прочего, предложены усовершенствованные способы очистки белка I2S, полученного рекомбинантным способом, для ферментозаместительной терапии. Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии, что рекомбинантный белок I2S может быть очищен из необработанных биологических материалов, таких как содержащая I2S клеточная культуральная среда, при помощи способа, включающего применение всего лишь четырех хроматографических колонок. Существующий общепринятый способ очистки рекомбинантного I2S для ферментозаместительной терапии включает применение 6 хроматографических колонок. Как описано в разделе примеров, рекомбинантные белки I2S, очищенные четырехколоночным способом согласно изобретению, соответствуют рыночным требованиям к степени очистки в США и многих других странах. Вдобавок, рекомбинантный фермент I2S, очищенный в соответствии с настоящим изобретением, сохраняет высокий процент  $S_a$ -формилглицина (FGly) (например, выше 70% и вплоть до 100%), что является важным для активности фермента I2S, и такие отличительные характеристики, как содержание сиаловой кислоты и карта гликанов, которые могут улучшить биодоступность и/или лизосомное нацеливание рекомбинантного белка I2S. Следовательно, в настоящем изобретении предложен эффективный, менее затратный и более быстрый способ очистки рекомбинантного белка I2S. Настоящее изобретение является в особенности целесообразным для очистки рекомбинантного белка I2S, вырабатываемого в бессывороточной среде.

Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ очистки рекомбинантного белка I2S из неочищенного препарата при помощи процесса, основанного на одном или более способах из анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, хроматографии с комбинированным режимом и хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает менее 6 (например, менее 5, менее 4 или менее 3) хроматографических этапов. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает 2, 3, 4 или 5 хроматографических этапов. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает 4 хроматографических этапа. В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению содержит менее чем 100 нг/мг белка клетки-хозяина (БКХ) (например, менее чем 90 нг/мг БКХ, менее чем 80 нг/мг БКХ, менее чем 70 нг/мг БКХ, менее чем 60 нг/мг БКХ, менее чем 50 нг/мг БКХ, менее чем 40 нг/мг БКХ, менее чем 30

нг/мг БКХ, менее чем 20 нг/мг БКХ, менее чем 10 нг/мг БКХ).

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим видом анионообменной хроматографии является Q хроматография. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим видом катионообменной хроматографии является SP хроматография. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим видом хроматографии с комбинированным режимом является гидроксипапитовая (НА) хроматография. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим видом хроматографии с гидрофобным взаимодействием является хроматография с фенилом.

Предполагается, что анионообменную хроматографию (например, Q-колонку), катионообменную хроматографию (например, SP-колонку), хроматографию с комбинированным режимом (например, НА-колонку) и хроматографию с гидрофобным взаимодействием (например, колонку с фенилом) можно проводить в любом порядке. В некоторых вариантах реализации изобретения способ согласно настоящему изобретению включает проведение указанных этапов в таком порядке: анионообменная хроматография (например, Q-колонка), катионообменная хроматография (например, SP-колонка), хроматография с комбинированным режимом (например, НА-колонка) и хроматография с гидрофобным взаимодействием (например, колонка с фенилом).

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в анионообменную хроматографическую колонку (например, Q-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до уровня pH, составляющего около 5,0-7,0 (например, около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0), и проводимости, составляющей около 10-20 мСм/см (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мСм/см). В некоторых вариантах реализации изобретения pH доводят, применяя 1М ацетат натрия. В некоторых вариантах реализации изобретения проводимость доводят, применяя 5М хлорид натрия. В некоторых вариантах реализации изобретения анионообменную хроматографическую колонку после загрузки промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию соли (например, NaCl) в диапазоне от около 140 до 200 мМ (например, около 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 или 200 мМ) с pH, составляющим около 5,0-7,0 (например, около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0). В некоторых вариантах реализации изобретения анионообменную хроматографическую колонку элюируют, применяя элюирующий буфер, характеризующийся линейным градиентом соли (например, NaCl). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий линейный градиент NaCl характеризуется диапазоном, составляющим около 0-500 мМ NaCl (например, около 0-400, около 0-350, около 0-300, около 50-500, около 150-500, около 150-450, около 150-400 мМ).

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в катионообменную хроматографическую колонку (например, SP-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до проводимости в диапазоне между около 1 и 20 мСм/см (например, между около 1 и 15 мСм/см, между около 1 и 10 мСм/см, между около 1 и 8 мСм/см, между около 1 и 6 мСм/см, между около 1 и 4 мСм/см, между около 2 и 4 мСм/см). В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в катионообменную хроматографическую колонку (например, SP-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до проводимости в диапазоне между около 2 и 4 мСм/см (например, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 мСм/см). В некоторых вариантах реализации изобретения значение проводимости доводят, разводя элюат из анионообменной хроматографической колонки H<sub>2</sub>O в соотношении, составляющем около 1-2:1 (например, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1). В некоторых вариантах реализации изобретения значение проводимости доводят диафильтрацией. В некоторых вариантах реализации изобретения катионообменную хроматографию проводят на колонке при уровне pH, составляющем около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5). В некоторых вариантах реализации изобретения катионообменную хроматографию проводят на колонке с буфером, содержащим концентрацию фосфата (например, NaPO<sub>4</sub>) в диапазоне от около 0,01 до около 0,1М (например, около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 или 0,1М). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий уровень pH составляет около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5).

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до концентрации фосфата (например, NaPO<sub>4</sub>) в диапазоне от около 0,001 до около 0,01 М (например, около 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009 или 0,01 М) и уровня pH, составляющего около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5). В некоторых вариантах реализации изобретения колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) после загрузки промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий фосфат (например, 1-10 мМ фосфат натрия или калия) с нейтральными или практически нейтральным pH. В некоторых вариантах реализации изобретения загруженную колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию фосфата в диапазоне, составляющем около 10-20 мМ (например, около 10-18, 10-16, 10-15, 12-20, 14-18, 14-16 мМ). В некоторых вариантах реализации изобретения загруженную колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий фосфат в концентрации большей, чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 мМ. В не-

которых вариантах реализации изобретения элюирование из колонки для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонки) проводят при помощи градиентного фосфатного буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий элюирующий буфер может характеризоваться фосфатным градиентом, составляющим около 1-400 мМ (например, 1-300 мМ, 1-200 мМ, 1-150 мМ, 1-100 мМ, 10-350 мМ, 10-300 мМ, 10-250 мМ, 10-200 мМ, 10-150 мМ, 10-140 мМ, 10-130 мМ, 10-120 мМ, 10-110 мМ, 10-100 мМ, 10-90 мМ, 10-80 мМ, 10-70 мМ, 10-60 мМ, 10-50 мМ) фосфата натрия или фосфата калия. В некоторых вариантах реализации изобретения элюирование из НА-колонки проводят при помощи ступенчатого повышения концентрации фосфата в элюирующем буфере. В некоторых вариантах реализации изобретения ступенчатые элюирующие буферы могут содержать фосфат (например, фосфат натрия) в концентрации, выбранной из 10 мМ, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения элюирование из колонки для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонки) проводят при помощи элюирующего буфера, содержащего фосфат (например, фосфат натрия) в концентрации в диапазоне от около 50 до 150 мМ (например, выбранной из концентраций фосфата (например, фосфата натрия), составляющих 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 мМ и их комбинаций).

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (например, колонку с фенилом) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до концентрации соли (например, NaCl) в диапазоне от около 0,5 до около 2,0М (например, около 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0М NaCl) и уровня pH, составляющего около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0). В некоторых вариантах реализации изобретения колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием после загрузки промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию соли (например, NaCl) в диапазоне от около 0,5 до 2,0М (например, около 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0М NaCl) при уровне pH, составляющем около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0). В некоторых вариантах реализации изобретения колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием элюируют, применяя элюирующий буфер, содержащий концентрацию соли (например, NaCl) в диапазоне от около 0,1 до около 0,5М (например, около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, или 0,5М NaCl) при уровне pH, составляющем около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0).

В некоторых вариантах реализации изобретения каждая из колонок для анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, хроматографии с комбинированным режимом и хроматографии с гидрофобным взаимодействием имеет высоту в диапазоне, составляющем 14-25 см (например, 15-25 см, 15-20 см, 14-24 см, 14-22 см, 14-20 см или 16-18 см). В некоторых вариантах реализации изобретения каждая из колонок для анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, хроматографии с комбинированным режимом и хроматографии с гидрофобным взаимодействием имеет высоту, составляющую около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 см.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает этап вирусной инактивации перед загрузкой неочищенного препарата в первую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах реализации изобретения этап вирусной инактивации включает добавление в неочищенный препарат детергента. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает этап вирусного удаления после последней хроматографической колонки. В некоторых вариантах реализации изобретения способ согласно изобретению дополнительно включает этап ультрафильтрации и/или диафильтрации. В некоторых вариантах реализации изобретения этап ультрафильтрации и/или диафильтрации включает перемещение очищенного рекомбинантного белка I2S в буфер лекарственного препарата.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение применяют для очистки рекомбинантного белка I2S, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 50% (например, по меньшей мере на около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%) идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение применяется для очистки рекомбинантного белка I2S, имеющего аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение применяют для очистки рекомбинантного белка I2S, вырабатываемого клетками млекопитающих, культивируемыми в суспензии в бессывороточной среде. В некоторых вариантах реализации изобретения в бессывороточной среде, подходящей для целей изобретения, отсутствуют компоненты животного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения бессывороточная среда, подходящая для целей изобретения, является химически определенной средой. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки млекопитающих культивируют в биореакторе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки млекопитающих коэкспрессируют рекомбинантный белок I2S и формилглицин-образующий фермент (FGE). В некоторых вариантах реализации изобретения клетки млекопитающих являются клетками человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения неочищенный препарат, применяемый в способе согласно изобретению, получают из бессывороточной среды, содержащий рекомбинантный белок I2S, секретируемый из клеток млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения неочищенный препарат, применяемый в способе согласно изобретению, получают, размораживая замороженный

препарат среды.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению в среднем содержит 16-22 (например, 16-21, 16-20, 16-19, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19) сиаловых кислот на молекулу. В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению в среднем содержит 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 сиаловых кислоты на молекулу.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере около 70% (например, по меньшей мере около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 человеческого I2S (SEQ ID NO: 1), преобразованных в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly). В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению содержит практически 100% остатков цистеина, соответствующих Cys59 человеческого I2S (SEQ ID NO: 1), преобразованных в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly). В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению характеризуется специфической активностью, составляющей по меньшей мере около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 Е/мг, определенной при помощи *in vitro* анализа активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению характеризуется клеточным поглощением, составляющем более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95%, определенным при помощи *in vitro* анализа поглощения.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению характеризуется картой гликанов, содержащей группы из семи пиков, соответствующих нейтральному (группа пиков 1), моносиалированному (группа пиков 2), дисиалированному (группа пиков 3), монофосфорилированному (группа пиков 4), трисиалированному (группа пиков 5), тетраксилированному (группа пиков 6) и дифосфорилированному (группа пиков 7) белку I2S, соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения карта гликанов получена после расщепления нейраминидазой. В других вариантах реализации изобретения карта гликанов получена после расщепления щелочной фосфатазой.

Среди прочего, в настоящем изобретении предложен очищенный рекомбинантный белок I2S, описанный в данном документе, и содержащие его фармацевтические составы или препараты. В некоторых вариантах реализации изобретения препарат изготовлен для внутривенного, подкожного и/или интратекального введения. В настоящем изобретении также предложены способы лечения синдрома Хантера путем введения нуждающемуся в лечении субъекту очищенного рекомбинантного белка I2S, содержащего его фармацевтического состава или препарата.

Употребляемые в данном документе термины "белок I2S", "I2S", "фермент I2S" или их грамматические эквиваленты относятся к получению молекул рекомбинантного белка I2S, если не указано иное.

Употребляемые в данной заявке термины "около" и "около" используются как эквивалентные. Подразумевается, что любые численные значения, приведенные в данной заявке с или без около/около, включают любые нормальные отклонения, очевидные для специалиста в соответствующей области техники.

Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения станут понятны из нижеприведенного подробного описания изобретения. При этом стоит понимать, что подробное описание, хотя и указывает варианты реализации настоящего изобретения, приведено исключительно в иллюстративных, но не ограничительных целях. Различные изменения и модификации, которые входят в объем изобретения, станут понятны для специалистов в данной области техники из подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

Описанные ниже фигуры, которые представляют собой графические материалы, приведены исключительно в иллюстративных, но не ограничительных целях.

На фиг. 1 проиллюстрирована типовая схема очистки рекомбинантного I2S, вырабатываемого в бессывороточной среде;

на фиг. 2 - типовые пептидные карты очищенного рекомбинантного I2S AF в сравнении с контрольным I2S;

на фиг. 3 - типовой ДСН-ПААГ-анализ (с серебром) очищенного рекомбинантного I2S AF;

на фиг. 4 - типовой анализ профиля заряда очищенного рекомбинантного I2S AF при помощи ионообменной хроматографии;

на фиг. 5 - типовые профили карт гликанов очищенного рекомбинантного I2S AF;

на фиг. 6 - типовой анализ активности (Е/мг) после этапа вирусной инактивации НМ осветленного сбора рекомбинантного I2S;

на фиг. 7 - типовой анализ ЭХ-ВЭЖХ после этапа вирусной инактивации НМ осветленного сбора рекомбинантного I2S;

на фиг. 8 - типовой ДСН-ПААГ с обработкой серебряным красителем очищенного рекомбинантного белка I2S;

на фиг. 9 - типовая пептидная карта для очищенного рекомбинантного фермента I2S, вырабатываемого клеточной линией I2S-AF 2D, выращиваемой в бессывороточных условиях культивирования (верх-

няя панель), в сравнении с контролем;

на фиг. 10 - типовые профили гликанов, полученные для очищенных рекомбинантных ферментов I2S, вырабатываемых клеточными линиями I2S-AF 2D и 4D, выращиваемыми в бессывороточных условиях культивирования, в сравнении с контролем;

на фиг. 11 - типовой профиль заряда для очищенного рекомбинантного фермента I2S, вырабатываемого клеточной линией I2S-AF 2D, выращиваемой в бессывороточных условиях культивирования, в сравнении с контролем.

Определения.

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для нижеприведенных терминов, а также других терминов, приведены в продолжение всего описания изобретения.

Около или приблизительно. Употребляемый в данном документе термин "около" или "приблизительно", применяемый в отношении одной или более представляющих интерес величин, обозначает величину, которая является сходной с указанной заданной величиной. В определенных вариантах реализации изобретения термин "около" или "приблизительно" относится к диапазону величин, который попадает в пределы 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в обе стороны (более чем или менее чем) от указанной заданной величины, если не указано иное, либо иное не очевидно из контекста (за исключением случая, когда такое число превышало бы 100% от возможной величины).

Биологически активный. Употребляемая в данном документе фраза "биологически активный" относится к характеристике любого вещества, которое обладает активностью в биологической системе (например, клеточной культуре, организме и т.д.). Например, вещество, которое при введении в организм оказывает на это организм биологический эффект, считается биологически активным. Биологическую активность также можно определить при помощи методов *in vitro* анализа (например, *in vitro* ферментного анализа, такого как анализ выделения сульфата). В конкретных вариантах реализации изобретения, если белок или полипептид является биологически активным, часть этого белка или полипептида, которая обладает по меньшей мере одним видом биологической активности белка или полипептида, обычно называют "биологически активной" частью. В некоторых вариантах реализации изобретения белок получают и/или очищают от клеточной культуральной системы, которая проявляет биологическую активность при введении субъекту. В некоторых вариантах реализации изобретения белок требует дополнительной обработки для того, чтобы стать биологически активным. В некоторых вариантах реализации изобретения белок для того, чтобы стать биологически активным, требует проведения посттрансляционных модификаций, таких как, без ограничений, гликозилирование (например, сиалирование), фарнезилирование, расщепление, фолдинг, конверсия в формилглицин и комбинации вышеперечисленного. В некоторых вариантах реализации изобретения белок, полученный в виде проформы (т.е. незрелой формы), может требовать проведения дополнительной модификации для того, чтобы стать биологически активным.

Катион-независимый рецептор маннозо-6-фосфата (CI-MPR). Употребляемый в данном документе термин "катион-независимый рецептор маннозо-6-фосфата (CI-MPR)" относится к клеточному рецептору, который связывает маннозо-6-фосфатные (M6P) метки предшественника кислой гидролазы в аппарате Гольджи, которые отвечают за транспорт в лизосомы. Кроме маннозо-6-фосфатов CI-MPR также связывает другие белки, включая IGF-II. CI-MPR известен также под названиями "M6P/IGF-II рецептора", "CI-MPR/IGF-II рецептора", "IGF-II рецептора" или "IGF2 рецептора". Эти термины и их аббревиатуры употребляются в данном документе взаимозаменяемо.

Хроматография. Употребляемый в данном документе термин "хроматография" относится к способу разделения смесей. Как правило, смесь растворяют в жидкости, называемой "подвижной фазой", при помощи которой ее проводят через структуру, содержащую другое вещество, называемое "стационарной фазой". Колоночная хроматография представляет собой способ разделения, в котором неподвижный слой находится в трубке, т.е. колонке.

Разбавитель. Употребляемый в данном документе термин "разбавитель" относится к фармацевтически приемлемому (например, безопасному и нетоксичному для применения на людях) веществу для разбавления, применяемому для получения восстановленного препарата. Типовые разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), pH буферные растворы (например, фосфатно-солевой буферный раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Элюирование. Употребляемый в данном документе термин "элюирование" относится к процессу экстракции одного вещества из другого путем промывки раствором. Например, в ионообменной хроматографии элюирование - это процесс, предназначенный для промывки загруженных смол для удаления захваченных ионов.

Элюат. Употребляемый в данном документе термин "элюат" относится к комбинации "носителя" подвижной фазы и анализируемого материала, который выявляют в результате хроматографии, как правило, в результате элюирования.

Ферментозаместительная терапия (ФЗТ). Употребляемый в данном документе термин "ферментозаместительная терапия (ФЗТ)" относится к любой терапевтической стратегии, которая ликвидирует дефицит ферментов путем введения необходимых ферментов. После введения фермент захватывается

клетками и транспортируется в лизосому, где фермент действует таким образом, чтобы уничтожить материал, который накопился в лизосомах вследствие дефицита ферментов. Как правило, для того чтобы лизосомная ферментозаместительная терапия была эффективной, терапевтический фермент доставляют в лизосомы соответствующих клеток тканей-мишеней, в которых проявляется дефект накопления.

Уравновешивать или уравновешивание. Употребляемые в данном документе применительно к хроматографии термины "уравновешивать" и "уравновешивание" относятся к процессу приведения первой жидкости (например, буфера) в баланс с другой, в общем случае для того, чтобы достичь стабильного и одинакового распределения компонентов жидкости (например, буфера). Например, в некоторых вариантах реализации изобретения хроматографическую колонку можно уравновесить посредством пропускания одного или более объемов необходимой жидкости (например, буфера) через колонку.

Улучшаться, повышаться или снижаться. При употреблении в данном документе при помощи терминов "улучшаться", "повышаться" или "снижаться" или их грамматических эквивалентов, оценивают величины относительно базового измерения, такого как измерение, проведенное для одной и той же особи до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение, проведенное для контрольной особи (или нескольких контрольных особей) в отсутствие лечения, описанного в документе. "Контрольной особью" является особь, пораженная той же самой формой лизосомной болезни накопления, что и проходящая лечение особь, приблизительно того же возраста, что и проходящая лечение особь (для гарантии того, что стадии заболевания у проходящей лечение особи и контрольной особи(ей) сравнимы).

Примеси. Употребляемый в данном документе термин "примеси" относится к веществам, находящимся в ограниченном объеме жидкости, газа или твердого тела, которые отличаются по химическому составу от целевого вещества или соединения. Примеси называют также загрязняющими веществами.

Линкер. Употребляемый в данном документе термин "линкер" в случае слитого белка относится к аминокислотной последовательности, отличной от той, которая находится в данной конкретной позиции в природном белке, и в общем случае сконструирован гибким или с возможностью помещения его в структуру, как, например,  $\alpha$ -спираль между двумя белковыми компонентами. Линкер также называют спейсером.

Загрузка. Употребляемый в данном документе термин "загрузка" в случае хроматографии относится к добавлению содержащей образцы жидкости или твердофазного вещества в колонку. В некоторых вариантах реализации изобретения конкретные компоненты образца, загружаемого в колонку, впоследствии захватываются при прохождении загруженного образца через колонку. В некоторых вариантах реализации изобретения конкретные компоненты образца, загружаемого в колонку, не захватываются или "протекают через" колонку при прохождении загруженного образца через колонку.

Полипептид. В контексте данного документа "полипептид" в общем случае представляет собой цепь из по меньшей мере двух аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид может содержать по меньшей мере 3-5 аминокислот, каждая из которых соединена с другими посредством по меньшей мере одной пептидной связи. Специалистам в данной области техники понятно, что иногда полипептиды включают аминокислоты "неприродного происхождения" или другие соединения, которые способны интегрироваться в полипептидную цепь.

Объединение. Употребляемый в данном документе термин "объединение" в случае хроматографии относится к соединению одной или более фракций жидкости, которые прошли через колонку. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения одну или более фракций, которые содержат необходимый компонент образца, который был отделен при помощи хроматографии (например, "пиковые фракции"), можно "объединять" вместе для получения единой "объединенной" фракции.

Заместительный фермент. Употребляемый в данном документе термин "заместительный фермент" относится к любому ферменту, который может действовать таким образом, чтобы, по меньшей мере, частично заместить дефицитный или отсутствующий фермент при заболевании, лечение которого проводится. В некоторых вариантах реализации изобретения термин "заместительный фермент" относится к любому ферменту, который может действовать таким образом, чтобы, по меньшей мере, частично заместить дефицитный или отсутствующий лизосомный фермент при лизосомной болезни накопления, лечение которой проводится. В некоторых вариантах реализации изобретения заместительный фермент способен снижать количество накопленного материала в лизосомах млекопитающих или может снимать или облегчать один или более симптомов лизосомной болезни накопления. Заместительные ферменты, подходящие для изобретения, включают лизосомные ферменты, как дикого типа, так и модифицированные, и могут быть получены при помощи рекомбинантных и синтетических методов либо очищены из природных источников. Заместительный фермент может быть рекомбинантным, синтетическим, генно-активируемым или природным ферментом.

Растворимый. Употребляемый в данном документе термин "растворимый" относится к способности терапевтического вещества образовывать гомогенный раствор. В некоторых вариантах реализации изобретения растворимость терапевтического вещества в растворе, в который оно введено и посредством которого оно доставляется к целевому участку действия, достаточна для того, чтобы сделать возможной доставку терапевтически эффективного количества терапевтического вещества к целевому участку действия. На растворимость терапевтических веществ могут влиять несколько факторов. Например, факто-

ры, которые могут влиять на растворимость белка, включают ионную силу, аминокислотную последовательность и наличие других совместно растворимых веществ или солей (например, солей кальция). В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтические вещества согласно настоящему изобретению растворяются в соответствующих фармацевтических составах.

**Стабильность.** Употребляемый в данном документе термин "стабильность" относится к способности терапевтического вещества (например, рекомбинантного фермента) сохранять терапевтическую эффективность (например, всю или большую часть своей предполагаемой биологической активности и/или физикохимической функции) на протяжении длительных периодов времени. Стабильность терапевтического вещества и способность фармацевтического состава поддерживать стабильность такого терапевтического вещества может быть достигнута на протяжении длительных периодов времени (например, на протяжении по меньшей мере 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 месяцев или более). В контексте изготовления препаратов стабильным препаратом является такой, в котором терапевтическое вещество сохраняет свои физические и/или химические функции и биологическую активность при хранении и во время обработки (например, замораживания/размораживания, механического смешивания и лиофилизации). Стабильность белков можно определить по образованию высокомолекулярных (ВМ) агрегатов, потере ферментативной активности, образованию пептидных фрагментов и сдвига профилей заряда.

**Вирусная обработка.** Употребляемый в данном документе термин "вирусная обработка" относится к "вирусному удалению", во время которого вирусы просто удаляют из образца, или "вирусной инактивации", во время которой вирусы остаются в образце, но в неактивной форме. В некоторых вариантах реализации изобретения для вирусного удаления, среди прочего, можно применять нанофильтрацию и/или хроматографические методы. В некоторых вариантах реализации изобретения для вирусной инактивации, среди прочего, можно применять инактивацию раствором, инактивацию детергентом, пастеризацию, инактивацию кислотным рН и/или инактивацию ультрафиолетом.

#### **Подробное описание изобретения**

В изобретении, среди прочего, предложен способ очистки рекомбинантного белка I2S для ферментозаместительной терапии на основании процесса, включающего менее 6 хроматографических этапов. В некоторых вариантах реализации изобретения в настоящем изобретении предложен способ очистки рекомбинантного белка I2S из неочищенного препарата при помощи процесса на основании одного или более способов из анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, хроматографии с комбинированным режимом и хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах реализации изобретения в настоящем изобретении предложен способ очистки рекомбинантного белка I2S из неочищенного препарата при помощи Q хроматографии, гидроксипатитовой (НА) хроматографии, SP хроматографии и хроматографии с фенилом. В настоящем изобретении дополнительно предложен очищенный рекомбинантный белок I2S и способ его применения.

Различные аспекты изобретения детально описаны в нижеприведенных подразделах. Использование подразделов не ограничивает изобретение. Каждый подраздел можно применять к любому аспекту изобретения. В настоящей заявке употребление "или" обозначает "и/или", если не указано иное.

Рекомбинантный белок I2S.

При употреблении в данном документе белок I2S представляет собой любой белок или часть белка, который может, по меньшей мере, частично заменить активность белка идуронат-2-сульфатазы (I2S) природного происхождения или снять одно или более клинических проявлений или симптомов, связанных с дефицитом I2S. Употребляемые в данном документе термины "фермент I2S" и "белок I2S" и их грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

Как правило, человеческий белок I2S вырабатывается в форме предшественника. Форма предшественника человеческого I2S содержит сигнальный пептид (аминокислотные остатки 1-25 полноразмерного предшественника), пропептид (аминокислотные остатки 26-33 полноразмерного предшественника) и цепь (остатки 34-550 полноразмерного предшественника), которая может быть дополнительно процессирована в 42 кДа цепь (остатки 34-455 полноразмерного предшественника) и 14 кДа цепь (остатки 446-550 полноразмерного предшественника). Обычно форму предшественника называют также полноразмерным предшественником или полноразмерным белком I2S, который содержит 550 аминокислот. Аминокислотные последовательности зрелой формы (SEQ ID NO: 1) с удаленным сигнальным пептидом и полноразмерный предшественник (SEQ ID NO: 2) типового белка I2S дикого типа или природного происхождения приведены в табл. 1. Сигнальный пептид выделен подчеркиванием. Вдобавок, в табл. 1 также приведены аминокислотные последовательности изоформ а и b предшественника человеческого белка I2S, SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

Таблица 1. Человеческая идуронат-2-сульфатаза

<b>Зрелая форма</b>	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQN AFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKEN GYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDG ELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLEKMKTSASPFFLAVGYH KPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQ ALNISVPYGPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTII AFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLF PYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFH VELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDK PSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDDL QDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:1)
<b>Полноразмерный предшественник (изоформа а)</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVSSVCV ALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPS LGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTR RLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQ STEQAIQLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQQRKIRQSYFAS VSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFD VATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVE LVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYL PGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWV GFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDDLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:2)
<b>Предшественник, изоформа б</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVSSVCV ALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPS LGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTR RLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQ STEQAIQLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQEDQSSSTGFR LKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
<b>Предшественник, изоформа с</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVSSVCV ALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPS LGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTR RLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQ STEQAIQLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQQRKIRQSYFAS VSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGFMLMRTNT(SEQ ID NO:4)

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S представляет собой зрелый человеческий белок I2S (SEQ ID NO: 1). Как раскрыто в данном документе, SEQ ID NO: 1 представляет каноническую аминокислотную последовательность человеческого белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения белок I2S может представлять собой сплайс-изоформу и/или вариант SEQ ID NO: 1, которые образуются в результате транскрипции на другом участке инициации в пределах 5' UTR гена I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S может быть гомологом или аналогом зрелого человеческого белка I2S. Например, гомолог или аналог зрелого человеческого белка I2S может представлять собой модифицированный зрелый человеческий белок I2S, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с белком I2S дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO: 1), и при этом сохранять значительную часть активности белка I2S. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени гомологичным зрелому человеческому белку I2S (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени идентичным зрелому человеческому белку I2S (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит фрагмент или часть зрелого человеческого белка I2S.

В альтернативном варианте рекомбинантный белок I2S представляет собой полноразмерный белок

I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S может быть гомологом или аналогом полноразмерного человеческого белка I2S. Например, гомолог или аналог полноразмерного человеческого белка I2S может представлять собой модифицированный полноразмерный человеческий белок I2S, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с полноразмерным белком I2S дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO: 2), и при этом сохранять значительную часть активности белка I2S. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени гомологичным полноразмерному человеческому белку I2S (SEQ ID NO: 2). Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени идентичным SEQ ID NO: 2. Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит фрагмент или часть полноразмерного человеческого белка I2S. В контексте данного документа полноразмерный белок I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S представляет собой изоформу а человеческого белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S может быть гомологом или аналогом изоформы а человеческого белка I2S. Например, гомолог или аналог изоформы а человеческого белка I2S может представлять собой модифицированную изоформу а человеческого белка I2S, содержащую одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с изоформой а человеческого белка I2S дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO: 3), и при этом сохранять значительную часть активности белка I2S. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени гомологичным изоформе а человеческого белка I2S (SEQ ID NO: 3). Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичную SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени идентичным SEQ ID NO: 3. Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит фрагмент или часть изоформы а человеческого белка I2S. В контексте данного документа изоформа а человеческого белка I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S представляет собой изоформу b человеческого белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S может быть гомологом или аналогом изоформы b человеческого белка I2S. Например, гомолог или аналог изоформы b человеческого белка I2S может представлять собой модифицированную изоформу b человеческого белка I2S, содержащую одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с изоформой b человеческого белка I2S дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO: 4), и при этом сохранять значительную часть активности белка I2S. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени гомологичным изоформе b человеческого белка I2S (SEQ ID NO: 4). Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичную SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S является в значительной степени идентичным SEQ ID NO: 4. Например, рекомбинантный белок I2S может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит фрагмент или часть изоформы b человеческого белка I2S. В контексте данного документа изоформа b человеческого белка I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

Гомологи или аналоги человеческих белков I2S можно получить в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в данной области техники, такими как те, которые можно найти в ссылках, которые описывают подобные способы. В некоторых вариантах реализации изобретения консервативные аминокислотные замены включают замены, проводимые для аминокислот в рамках следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D. В некоторых вариантах реализации изобретения "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не приводит к изменению относительного заряда или характерных размеров белка, в котором проводится аминокислотная замена.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные белки I2S могут содержать компонент, который связывается с рецептором на поверхности клеток-мишеней для того, чтобы облегчить клеточное поглощение и/или лизосомное нацеливание. Например, таким рецептором может быть катион-независимый маннозо-6-фосфатный рецептор (CI-MPR), который связывает остатки маннозо-6-фосфата

(М6Р). Вдобавок, CI-MPR также связывает другие белки, включая IGF-II. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S содержит остатки М6Р на поверхности белка. В частности, рекомбинантный белок I2S может содержать бис-фосфорилированные олигосахариды, которые характеризуются более высокой аффинностью связывания с CI-MPR. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий фермент в среднем содержит до около 20% бис-фосфорилированных олигосахаридов на фермент. В других вариантах реализации изобретения подходящий фермент может содержать около 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60% бис-фосфорилированных олигосахаридов на фермент.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные ферменты I2S могут быть сшиты с компонентом для лизосомного нацеливания, который способен связываться с рецептором на поверхности клеток-мишеней. Подходящим компонентом для лизосомного нацеливания может быть IGF-I, IGF-II, RAP, p97, а также их варианты, гомологи или фрагменты (например, включая те пептиды, которые содержат последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную пептидным последовательностям зрелых человеческих IGF-I, IGF-II, RAP, p97 дикого типа). Компонент для лизосомного нацеливания может быть конъюгирован или сшит с белком или ферментом I2S в N-конце, C-конце либо с внутренней стороны.

Получение рекомбинантных белков I2S.

Настоящее изобретение можно применять для очистки рекомбинантного белка I2S, полученного различными способами. Например, белок I2S может быть получен рекомбинантным способом при помощи системы клеток-хозяев, сконструированных для экспрессии кодирующей I2S нуклеиновой кислоты. В альтернативном варианте белок I2S может быть получен путем активации эндогенного гена I2S.

Предполагается, что настоящее изобретение можно применять для очистки рекомбинантного белка I2S, полученного при помощи различных экспрессионных систем. Подходящие экспрессионные системы включают, например, яйцеклетки, клетки бакуловирусов, растений, дрожжей или млекопитающих.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные ферменты I2S вырабатываются в клетках млекопитающих. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают линию миеломы мышей штамма BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); ретинобласты человека (PER.C6 (CruCell, Leiden, The Netherlands)); почечную линию обезьян CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональную почечную линию человека (клетки 293 или 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); клеточную линию фибросаркомы человека (например, HT1080); клетки почек новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомяка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почек собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанные способы согласно настоящему изобретению применяют для очистки рекомбинантных ферментов I2S, полученных из клеток человека (например, HT1080). В некоторых вариантах реализации изобретения указанные способы согласно настоящему изобретению применяют для очистки рекомбинантных ферментов I2S, полученных из клеток CHO.

Как правило, клетки, которые сконструированы для экспрессии рекомбинантного I2S, могут содержать трансген, который кодирует описанный в данном документе рекомбинантный белок I2S. Следует учитывать, что нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный I2S могут содержать регуляторные последовательности, регуляторные последовательности генов, промоторы, некодирующие последовательности и/или другие подходящие последовательности для экспрессии рекомбинантного I2S. Как правило, кодирующая область функционально связана с одним или более из этих компонентов нуклеиновой кислоты.

"Регуляторные последовательности", как правило, относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5' некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3' некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, которые оказывают влияние на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной с ней кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны и последовательности узнавания полиаденилирования. В некоторых случаях "регуляторные последовательности" также называют "регуляторными последовательностями генов".

"Промотором" обычно называют нуклеотидную последовательность, способную управлять экспрессией кодирующей последовательности или функциональной РНК. В общем случае кодирующая последовательность расположена в направлении 3' относительно последовательности промотора. Последовательность промотора состоит из близкорасположенных и более удаленных вышележащих элементов, при этом последнее часто называют энхансерами. Соответственно, "энхансер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может стимулировать активность промотора и может являться

природным элементом промотора или гетерологичным элементом, добавленным для того, чтобы повысить уровень или тканевую специфичность промотора. Промоторы могут быть целиком получены из нативного гена либо могут быть составлены из разных элементов, полученных из разных промоторов природного происхождения, или даже содержать синтетические нуклеотидные сегменты. Специалистам в данной области техники понятно, что разные промоторы могут управлять экспрессией гена в разных тканях или типах клеток, либо на разных стадиях развития, либо в ответ на разные внешние условия.

"3' некодирующими последовательностями" обычно называются нуклеотидные последовательности, расположенные ниже кодирующей последовательности, и включающие последовательности узнавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление трактов полиадениловой кислоты к 3' концу предшественника мРНК.

"Трансляционной лидерной последовательностью" или "5' некодирующими последовательностями" обычно называются нуклеотидные последовательности, расположенные в гене между последовательностью промотора и кодирующей последовательностью. Трансляционная лидерная последовательность присутствует в полностью процессированной мРНК выше последовательности инициации трансляции. Трансляционная лидерная последовательность может влиять на процессинг первичного транскрипта в мРНК, стабильность мРНК или трансляционную эффективность.

Как правило, термин "функционально связанный" относится к соединению двух или более нуклеотидных фрагментов в один нуклеотидный фрагмент таким образом, что один фрагмент влияет на функционирование другого. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. если кодирующая последовательность находится под транскрипционным управлением промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Кодирующая область трансгена может содержать одну или более молчащих мутаций для оптимизации частоты использования кодонов для конкретного типа клеток. Например, кодоны трансгена I2S можно оптимизировать для экспрессии в клетках позвоночных. В некоторых вариантах реализации изобретения кодоны трансгена I2S можно оптимизировать для экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения кодоны трансгена I2S можно оптимизировать для экспрессии в клетках человека.

В некоторых случаях конструкция может содержать дополнительные компоненты, такие как один или более из следующих элементов: сайт сплайсинга, последовательность энхансера, ген селектируемого маркера под управлением соответствующего промотора, ген амплифицируемого маркера под управлением соответствующего промотора и участок прикрепления к матриксу (УПМ) либо любой другой известный в данной области техники элемент, который повышает экспрессию области, в которую он вставлен.

После трансфицирования или трансдуцирования в клетки-хозяев подходящий вектор может экспрессировать внехромосомно (эписомально) или интегрироваться в геном клетки-хозяина.

Активация рекомбинантных белков I2S.

Как правило, рекомбинантный белок I2S активируют посредством посттрансляционной модификации консервативного цистеина (соответствующего аминокислоте 59 зрелого человеческого I2S) в формилглицин, также известный под названием 2-амино-3-оксопропионовой кислоты или оксо-аланина. Такую посттрансляционную модификацию можно осуществить при помощи фермента, известного под названием формилглицин-образующего фермента (FGE). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные ферменты I2S вырабатываются в клетках, которые экспрессируют также белок FGE. В конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантные ферменты I2S вырабатываются в клетках, которые характеризуются повышенной или усиленной экспрессией белка FGE. Например, клетки можно сконструировать для сверхэкспрессии FGE в комбинации с рекомбинантным I2S для облегчения получения препаратов I2S, содержащих высокие уровни активного фермента. В некоторых вариантах реализации изобретения сверхэкспрессию FGE достигают посредством экспрессии (например, сверхэкспрессии) экзогенного FGE при помощи стандартных рекомбинантных технологий. В некоторых вариантах реализации изобретения сверхэкспрессию FGE достигают посредством активации или усиления экспрессии эндогенного FGE, например, активируя или усиливая промотор эндогенного гена FGE. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный I2S, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок FGE, связаны нуклеиновой кислотой (например, спейсерной последовательностью), имеющей последовательность, соответствующую участку внутренней посадки рибосомы.

В настоящем изобретении можно применять любой FGE, обладающий способностью преобразовывать цистеин в формилглицин. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности белков FGE приведены в US 2004-0229250, полное содержание которой, относящееся к таким последовательностям, и сами последовательности в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Следует учитывать, что нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный FGE, могут содержать регуляторные последовательности, регуляторные последовательности генов, промоторы, некодирующие

последовательности и/или другие подходящие последовательности для экспрессии рекомбинантного FGE. Как правило, кодирующая область функционально связана с одним или более из этих компонентов нуклеиновой кислоты.

Среды и условия для культивирования клеток.

Для получения рекомбинантного белка I2S можно применять различные среды и условия для культивирования клеток. Например, рекомбинантный белок I2S можно получить в содержащей сыворотку или бессывороточной среде. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S получают в бессывороточной среде. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S получают в неживотной среде, т.е. среде, в которой отсутствуют компоненты животного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S получают в химически определенной среде. Употребляемый в данном документе термин "химически определенная питательная среда" относится к среде, практически все химические компоненты которой известны. В некоторых вариантах реализации изобретения химически определенная питательная среда не содержит компонентов животного происхождения, таких как сыворотка, сывороточные белки (например, альбумин или фетuin) и другие компоненты. В некоторых случаях химически определенная среда содержит один или более белков (например, белковых факторов роста или цитокинов). В некоторых случаях химически определенная питательная среда содержит один или более белковых гидролизатов. В других случаях химически определенная питательная среда является безбелковой средой, т.е. бессывороточной средой, которая не содержит белков, гидролизатов или компонентов с неизвестным составом.

В некоторых вариантах реализации изобретения химически определенная питательная среда может быть дополнена одним или более компонентами животного происхождения. Такие компоненты животного происхождения включают, но не ограничиваются этим, фетальную телячью сыворотку, лошадиную сыворотку, козлиную сыворотку, ослиную сыворотку, человеческую сыворотку и сывороточные белки, такие как альбумины (например, бычий сывороточный альбумин или человеческий сывороточный альбумин).

Для крупномасштабного получения рекомбинантных белков I2S можно применять различные условия клеточного культивирования, включая, но не ограничиваясь этим, культивирование в роллерных флаконах, периодическое культивирование в биореакторах и культивирование с подпиткой в биореакторах. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S получают при помощи клеток, культивируемых в суспензии. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S получают при помощи адгезивных клеток.

Типовые среды для клеток и условия культивирования описаны в разделе примеров. Дополнительные типовые способы и составы для получения рекомбинантного белка I2S описаны в предварительной заявке под названием "Способы и составы для получения рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы", поданной на регистрацию одновременно с настоящим документом, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Очистка рекомбинантного белка I2S.

В некоторых вариантах реализации изобретения в настоящем изобретении предложен способ очистки рекомбинантного белка I2S из неочищенного препарата при помощи процесса на основании одного или более способов из анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, хроматографии с комбинированным режимом и хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает менее 6 (например, менее 5, менее 4 или менее 3) хроматографических этапов. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает 2, 3, 4 или 5 хроматографических этапов. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает 4 хроматографических этапа. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ согласно настоящему изобретению включает проведение хроматографических этапов в таком порядке: анионообменная хроматография, хроматография с комбинированным режимом, катионообменная хроматография и хроматография с гидрофобным взаимодействием.

Неочищенный препарат.

В контексте данного документа неочищенный препарат может представлять собой любой биологический материал, включая необработанный биологический материал, содержащий рекомбинантный белок I2S. Например, неочищенный препарат может представлять собой необработанную клеточную культуральную среду, содержащую рекомбинантный белок I2S, секретируемый из клеток (например, клеток млекопитающих), вырабатывающих белок I2S, или исходные клеточные лизаты, содержащие белок I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения неочищенный препарат может представлять собой частично обработанную клеточную среду или клеточные лизаты. Например, клеточную среду или клеточные лизаты можно концентрировать, разводить, обрабатывать путем вирусной инактивации, вирусной обработки или вирусного удаления. В некоторых вариантах реализации изобретения для вирусного удаления, среди прочего, можно применять нанофильтрацию и/или хроматографические методы. В некоторых вариантах реализации изобретения для вирусной инактивации, среди прочего, можно применять инактивацию раствором, инактивацию детергентом, пастеризацию, инактивацию кислотным pH и/или

инактивацию ультрафиолетом. Клеточную среду или клеточные лизаты также можно обрабатывать протеазами, ДНКазами и/или РНКазами для того, чтобы снизить уровень белка и/или нуклеиновых кислот (например, ДНК или РНК) клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения необработанные или частично обработанные биологические материалы (например, клеточную среду или клеточный лизат) можно замораживать и хранить при выбранной температуре (например, 2-8, -4, -25, -75°C) на протяжении некоторого времени, а затем размораживать для очистки. В контексте данного документа неочищенный препарат также называют стартовым материалом или загрузочный материал.

Анионообменная хроматография.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные способы очистки рекомбинантного белка I2S включают анионообменную хроматографию. Вкратце, анионообменная хроматография представляет собой хроматографический метод, который основан на заряд-зарядовых взаимодействиях между отрицательно заряженным соединением и положительно заряженной смолой. В некоторых вариантах реализации изобретения анионообменная хроматография представляет собой сильную анионообменную хроматографию. В некоторых вариантах реализации изобретения анионообменную хроматографию применяют на первом этапе очистки терапевтического белка (например, рекомбинантного I2S).

Типовые анионообменные смолы включают, но не ограничиваются этим, четвертичные смолы аминов или "Q-смолы" (например, Капто™-Q, Q-Сефарозу®, QAE Сефадекс®); диэтиламиноэтановые (ДЭ-АЭ) смолы (например, ДЭАЭ-Трисакрил®, ДЭАЭ Сефарозу®, бензоилированный нафтоилированный ДЭАЭ, диэтиламиноэтил Сефацель®); смолы Amberjet®; смолы Amberlyst®; смолы Amberlite® (например, Amberlite® IRA-67, сильноосновную Amberlite®, слабоосновную Amberlite®), холестираминовую смолу, смолы ProPac® (например, ProPac® SAX-10, ProPac® WAX-10, ProPac® WCX-10); смолы TSK-GEL® (например, TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); и смолы Acclaim®. В определенных вариантах реализации изобретения анионообменной смолой является Q-смола.

Типичные подвижные фазы для анионообменной хроматографии включают относительно полярные растворы, такие как вода, ацетонитрил, органические спирты, такие как метанол, этанол и изопропанол, или растворы, содержащие 2-(N-морфолино)-этансульфоновую кислоту (МЭС). Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит около 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или около 100% полярного раствора. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит от около 1% до около 100%, от около 5% до около 95%, от около 10% до около 90%, от около 20% до около 80%, от около 30% до около 70% или от около 40% до около 60% полярного раствора в любое заданное время на протяжении этапа разделения.

В общем случае подвижная фаза содержит соль. Например, соль (например, хлорид натрия) может элюировать связанный белок из анионообменной колонки (например, хлорид является противоионом и происходит его обмен с целевым белком, который впоследствии выделяется). В некоторых вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит концентрацию соли от около 0 до около 1,0M, например, от около 0 до около 0,8M, от около 0 до около 0,6M, от около 0 до около 0,5M, от около 0 до около 0,4M, от около 0,05M до около 0,50M, от около 0,10M до около 0,45M, от около 0,10M до около 0,40M или от около 0,15M до около 0,40M. В некоторых вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит концентрацию соли, составляющую около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0M. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе является градиентной (например, линейно- или нелинейно-градиентной). В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе является постоянной. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе может пошагово повышаться или понижаться.

Как правило, подвижная фаза является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза не является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 14. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 10. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 7. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH, составляющего около 6,5. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH, составляющего около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10.

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в анионообменную хроматографическую колонку (например, Q-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до уровня pH, составляющего около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 или 7,5, и проводимости, составляющей около 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 мСм/см. pH можно доводить, применяя ацетат натрия (например, 1M), а проводимость можно доводить, применяя хлорид натрия (например, 5M). После загрузки анионообменную хроматографическую колонку можно промывать, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию соли (например, NaCl) в диапазоне от около 140 до 200 (например, около 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 или 200 mM) с pH, составляющим около 5,0-7,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 или 7,5). Анионообменную хроматографическую колонку

можно элюировать, применяя элюирующий буфер, характеризующийся линейным градиентом NaCl. Подходящий линейный градиент NaCl может характеризоваться диапазоном, составляющим около 0-500 мМ NaCl (например, около 0-400 мМ, около 0-350 мМ, около 0-300 мМ, около 50-500 мМ, около 150-500 мМ, около 150-450 мМ, около 150-400 мМ).

Катионообменная хроматография.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные способы очистки рекомбинантного белка I2S включают катионообменную хроматографию. Вкратце, катионообменная хроматография представляет собой хроматографический метод, который основан на заряд-зарядовых взаимодействиях между положительно заряженным соединением и отрицательно заряженной смолой. В некоторых вариантах реализации изобретения катионообменная хроматография представляет собой сильную катионообменную хроматографию.

На практике катионообменную хроматографию в общем случае проводят как с сильной, так и со слабой катионообменной колонкой, содержащей сульфониевые ионы, или со слабым катионообменником, обычно содержащим карбоксиметильную (КМ) или карбоксилатную (ККС) функциональную группу. Многие подходящие катионообменные смолы известны в данной области техники и являются коммерчески доступными, включая, но не ограничиваясь этим, SP-Сефарозу®, CM Сефарозу®; смолы Amberjet®; смолы Amberlyst®; смолы Amberlite® (например, Amberlite® IRA120); смолы ProPac® (например, ProPac® SCX-10, ProPac® WCX-10, ProPac® WCX-10); смолы TSK-GEL® (например, TSKgel Bio-Assist S; TSKgel SP-2SW, TSKgel SP-5PW; TSKgel SP-NPR; TSKgel SCX; TSKgel SP-STAT; TSKgel CM-5PW; TSKgel OApak-A; TSKgel CM-2SW, TSKgel CM-3SW и TSKgel CM-STAT); и смолы Acclaim®. В определенных вариантах реализации изобретения катионообменной смолой является смола SP-Сефароза®.

Типичные подвижные фазы для катионообменной хроматографии включают относительно полярные растворы, такие как вода, ацетонитрил, органические спирты, такие как метанол, этанол и изопропанол, или растворы, содержащие 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС). Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит около 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или около 100% полярного раствора. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит от около 1% до около 100%, от около 5% до около 95%, от около 10% до около 90%, от около 20% до около 80%, от около 30% до около 70% или от около 40% до около 60% полярного раствора в любое заданное время на протяжении этапа разделения.

В общем случае подвижная фаза содержит соль. Например, соль (например, хлорид натрия, фосфат натрия и т.д.) может элюировать связанный белок из катионообменной колонки (например, натрий является противоионом и происходит его обмен с целевым белком, который впоследствии выделяется). В некоторых вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит концентрацию соли от около 0 до около 1,0М, например, от около 0 до около 0,8М, от около 0 до около 0,6М, от около 0 до около 0,5М, от около 0 до около 0,4М, от около 0,05М до около 0,50М, от около 0,10М до около 0,45М, от около 0,10М до около 0,40М или от около 0,15М до около 0,40М. В некоторых вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит концентрацию соли, составляющую около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0М. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе является градиентной (например, линейно- или нелинейно-градиентной). В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе является постоянной. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация соли в подвижной фазе может пошагово повышаться или понижаться.

Как правило, подвижная фаза является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза не является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 14. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 10. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 7. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH, составляющего около 6,5. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH, составляющего около 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10.

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в катионообменную хроматографическую колонку (например, SP-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до проводимости в диапазоне между около 1 и 20 мСм/см (например, между около 1 и 15 мСм/см, между около 1 и 10 мСм/см, между около 1 и 8 мСм/см, между около 1 и 6 мСм/см, между около 1 и 4 мСм/см, между около 2 и 4 мСм/см). В конкретных вариантах реализации изобретения перед загрузкой в катионообменную хроматографическую колонку (например, SP-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до проводимости в диапазоне между около 2 и 4 мСм/см (например, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 мСм/см). Значение проводимости можно доводить, разводя неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию H<sub>2</sub>O в соотношении, составляющем, например, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 4,0:1, 5,0:1 или

10:1. Значение проводимости также можно доводить диафильтрацией в соответствующий буфер. Проводимость также можно доводить посредством диафильтрации в соответствующий буфер. В некоторых вариантах реализации изобретения катионообменную хроматографию проводят на колонке при уровне рН, составляющем около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5). В некоторых вариантах реализации изобретения катионообменную хроматографию проводят на колонке с буфером, содержащим концентрацию фосфата (например,  $\text{NaPO}_4$ ) в диапазоне от около 0,01М до около 0,1М (например, около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 или 0,1М). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий уровень рН составляет около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5).

Хроматография с комбинированным режимом.

Считается, что гидроксипатитовая хроматография (НА) является "псевдоаффинной" хроматографией или ионообменной хроматографией с "комбинированным режимом", и может применяться в соответствии с настоящим изобретением. Гидроксипатит представляет собой уникальную форму фосфата кальция, применяемую для фракционирования и очистки биологических молекул. В некоторых случаях можно применять кристаллический гидроксипатит, однако непрочность кристаллов может ограничивать скорости потоков и/или долговечность колонки. Два типа химически чистого керамического гидроксипатита - керамический гидроксипатит для СНТ типов I и II - являются макропористыми и сферическими и могут применяться при высоких скоростях потоков и давлениях. Тип I обычно характеризуется высокой способностью связывания белков, в то время как тип II обычно характеризуется более низкой способностью связывания белков. Общей формулой гидроксипатита является  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Kawasaki et al 1985). Функциональные группы содержат положительно заряженные пары ионов кальция кристалла (С-участки) и кластеры из шести отрицательно заряженных атомов кислорода, связанные с триплетами фосфатов кристалла (Р-участки). С-участки, Р-участки и гидроксилы распределены в определенном порядке на кристаллической поверхности, что в общем случае приводит к сложному взаимодействию с белками и другими молекулами.

Образец можно загружать в НА-колонку в фосфатный буфер со слабой ионной силой (например, 1-10 мМ фосфат натрия или калия) или при нейтральном или практически нейтральном рН. В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до концентрации фосфата (например,  $\text{NaPO}_4$ ) в диапазоне от около 0,001М до около 0,01М (например, около 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009 или 0,01М) и уровня рН, составляющего около 5,0-6,5 (например, около 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5). Загруженную НА-колонку обычно промывают отмывочным буфером с концентрацией фосфата сравнимой с соответствующей концентрацией для загрузочного буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) после загрузки промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий фосфат (например, 1-10 мМ фосфат натрия или калия) с нейтральными или практически нейтральным рН. Например, подходящий отмывочный буфер может содержать концентрацию фосфата, составляющую около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть целесообразно увеличивать количество фосфата в отмывочном буфере для того, чтобы создать более жесткие условия отмывки. Предполагается, что уровни М6Р, в частности уровни ди-М6Р, на поверхности белков I2S важны для лизосомного нацеливания. Повышенная концентрация фосфата в отмывочном буфере может избирательно удерживать белки I2S с высокими уровнями М6Р, в частности, ди-М6Р, на НА-колонке. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения целесообразный отмывочный буфер может содержать концентрацию фосфата большую, чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения загруженную колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию фосфата в диапазоне, составляющем около 10-20 мМ (например, около 10-18, 10-16, 10-15, 12-20, 14-18, 14-16 мМ). В некоторых вариантах реализации изобретения загруженную колонку для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонку) промывают, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию фосфата большую, чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 мМ.

Элюирование из НА-колонки обычно проводят при помощи градиентного фосфатного буфера. Например, подходящий элюирующий буфер может характеризоваться фосфатным градиентом, составляющим около 1-400 мМ (например, 1-300, 1-200, 1-150, 1-100, 10-350, 10-300, 10-250, 10-200, 10-150, 10-140, 10-130, 10-120, 10-110, 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50 мМ) фосфата натрия или фосфата калия. В некоторых вариантах реализации изобретения элюирование из НА-колонки проводят при помощи ступенчатого повышения концентрации фосфата в элюирующем буфере. В некоторых вариантах реализации изобретения ступенчатые элюирующие буферы могут содержать концентрацию фосфата, выбранную из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения элюирование из колонки для хроматографии с комбинированным режимом (например, НА-колонки) проводят при помощи элюирующего буфера, содержащего концентрацию фосфата (например, фосфата натрия) в диапазоне от около 50 до 150 мМ (например, выбранной из концентраций фосфата (например, фосфата натрия), составляющих 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130,

140, 150 мМ и их комбинаций).

Стоит учитывать, что известно множество разных комбинаций условий для НА-хроматографии, которые можно применять для доведения параметров до величин, подходящих для конкретного представляющего интерес белка (например, рекомбинантного I2S).

Хроматография с гидрофобным взаимодействием.

Хроматография с гидрофобным взаимодействием (ХГВ) представляет собой метод разделения, в котором свойства гидрофобности используются для отделения белков друг от друга. В случае этого типа хроматографии к стационарной колонке прикреплены гидрофобные группы, такие как фенил, октил или бутил. Белки, которые проходят через колонку и которые содержат на поверхности гидрофобные аминокислотные боковые цепи способны взаимодействовать и связываться с гидрофобными группами на колонке. Известные ХГВ-колонки включают, например, фенил-сефарозу.

Для ХГВ-разделения часто применяют условия, противоположные тем, которые применялись в ионообменной хроматографии. В общем случае в колонке изначально применяют буфер, характеризующийся высокой ионной силой, обычно - сульфат аммония. Соль в буфере снижает сольватацию растворенных в образце компонентов, таким образом, когда сольватация снижается, ставшие открытыми гидрофобные участки адсорбируются средой. Стационарная фаза в общем случае подобрана так, чтобы создавать гидрофобные взаимодействия с другими молекулами. Такие взаимодействия обычно слишком слабые в воде, однако добавление солей (например,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$  и  $\text{NaSCN}$ ) в буфер приводит к появлению гидрофобных взаимодействий. В некоторых вариантах реализации изобретения подвижная фаза содержит концентрацию соли от около 0,1М до около 3,0М, например от около 0,1М до около 1,5М, от около 0,2М до около 0,8М или от около 0,3М до около 0,5М.

В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза не является забуференной. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 14. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 10. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH от около 5 до около 7. В определенных вариантах реализации изобретения подвижная фаза забуферена до pH, составляющего около 5,0.

В некоторых вариантах реализации изобретения перед загрузкой в колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (например, колонку с фенилом) неочищенный препарат или промежуточный элюат, или проточную фракцию доводят до концентрации соли (например,  $\text{NaCl}$ ) в диапазоне от около 0,5М до около 2,0М (например, около 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0М  $\text{NaCl}$ ) и уровня pH, составляющего около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0). После загрузки колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием можно промывать, применяя отмывочный буфер, содержащий концентрацию соли (например,  $\text{NaCl}$ ) в диапазоне от около 0,5 до 2,0М (например, около 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0М) при уровне pH, составляющем около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0). В некоторых вариантах реализации изобретения колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием элюируют, применяя элюирующий буфер, содержащий концентрацию соли (например,  $\text{NaCl}$ ) в диапазоне от около 0,1 до около 0,5М (например, около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5М  $\text{NaCl}$ ) при уровне pH, составляющем около 4,5-6,0 (например, около 4,5, 5,0, 5,5 или 6,0).

Определение характеристик очищенных белков I2S.

Определить характеристики очищенного рекомбинантного белка I2S можно при помощи множества разных методов.

Степень очистки.

Степень очистки очищенного рекомбинантного белка I2S обычно определяют по уровню различных примесей (например, белка клетки-хозяина или ДНК клетки-хозяина), присутствующих в конечном продукте. Например, уровень белка клетки-хозяина (БКХ) можно определить при помощи ELISA или ДСН-ПААГ. В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S содержит менее 150 нг БКХ/мг белка I2S (например, менее 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 30, 20, 10 нг БКХ/мг белка I2S). В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S при проведении ДСН-ПААГ с окрашиванием серебром не имеет новых полос с интенсивностью большей, чем 0,05, 0,01, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 или 0,5% от контрольного образца. Можно использовать различные контрольные образцы, в частности те, которые утверждены регуляторными органами, такими как FDA.

Специфическая активность.

Характеристики очищенного рекомбинантного белка I2S можно получить, оценивая его функциональную и/или биологическую активность. Ферментативную активность состава, содержащего рекомбинантный I2S, можно определить при помощи известных в данной области техники методов. Как правило, указанные методы включают детекцию удаления сульфата из синтетического субстрата, последний метод известен под названием анализа выделение сульфата. Один из примеров анализа ферментативной активности включает применение ионной хроматографии. В данном методе оценивают количество сульфат-ионов, которые ферментативно высвобождаются рекомбинантным I2S из субстрата. Субстрат может

быть природным субстратом или синтетическим субстратом. В некоторых случаях субстратом является гепарин сульфат (например, гепарин дисахарид), дерматан сульфат или их функциональный эквивалент. Как правило, выделенный сульфат-ион анализируют при помощи ионной хроматографии с применением детектора по проводимости. В этом примере результаты можно приводить в Е/мг белка, где 1 единица соответствует количеству фермента, необходимого для высвобождения из субстрата 1 мкмоль сульфат-ионов в час. В некоторых вариантах реализации изобретения специфическая активность очищенного рекомбинантного белка I2S, определенная при помощи *in vitro* анализа активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарид, находится в диапазоне около 0-100 Е/мг, около 10-100 Е/мг, около 10-80 Е/мг, около 20-80 Е/мг, около 20-70 Е/мг, около 20-60 Е/мг, около 20-50 Е/мг, около 30-100 Е/мг, около 30-90 Е/мг, около 30-80 Е/мг, около 30-70 Е/мг, около 30-60 Е/мг, около 40-100 Е/мг, около 40-90 Е/мг, около 40-80 Е/мг, около 40-70 Е/мг, около 40-60 Е/мг. В некоторых вариантах реализации изобретения специфическая активность очищенного рекомбинантного белка I2S, определенная при помощи *in vitro* анализа активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарид, составляет по меньшей мере около 5 Е/мг, около 10 Е/мг, около 15 Е/мг, около 20 Е/мг, около 25 Е/мг, около 30 Е/мг, около 35 Е/мг, около 40 Е/мг, около 45 Е/мг, около 50 Е/мг, около 55 Е/мг, около 60 Е/мг, около 65 Е/мг, около 70 Е/мг, около 75 Е/мг, около 80 Е/мг, около 85 Е/мг, около 90 Е/мг, около 95 Е/мг или около 100 Е/мг. Типовые условия для проведения определения *in vitro* активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарид приведены ниже. Как правило, в этом методе определяют способность I2S высвобождать сульфат-ионы из субстрата природного происхождения - гепарин дисахарид. Количество высвобожденного сульфата можно определить при помощи ионной хроматографии. В некоторых случаях ионная хроматография включает применение детектора по проводимости. В качестве неограничивающего примера можно привести схему, в которой образцам сначала заменяют буфер на 10 мМ ацетата Na, pH 6, для устранения подавления фосфат-ионами в буферной смеси. Затем образцы разводят до 0,075 мг/мл реакционным буфером (10 мМ ацетата Na, pH 4,4) и инкубируют на протяжении 2 ч при 37°C с гепарин дисахаридом при соотношении фермента и субстрата, соответствующем 0,3 мкг I2S/100 мкг субстрата, в 30 мкл реакционном объеме. Затем реакцию останавливают путем нагревания образцов при 100°C на протяжении 3 мин. Анализ проводят, применяя аналитическую колонку Dionex IonPac AS18 с предколонкой IonPac AG18. Применяют изократический метод с 30 мМ гидроксида калия при 1,0 мл/мин на протяжении 15 минут. Количество сульфата, высвобожденного образцом I2S, рассчитывают, применяя линейно-регрессионный анализ сульфатных проб в диапазоне от 1,7 до 16,0 нмоль. Фиксируемую величину выражают в единицах на мг белка, где 1 единица соответствует 1 мкмоль сульфата, высвобождаемого в час, а концентрацию белка определяют при помощи измерений A280.

В некоторых вариантах реализации изобретения ферментативную активность рекомбинантного белка I2S можно также определить при помощи многих других методов, известных в данной области техники, таких как, например, анализ с 4-MUF, в котором оценивают гидролиз 4-метилумбеллиферил-сульфата на сульфат и природный флуоресцентный 4-метилумбеллиферил (4-MUF). В некоторых вариантах реализации изобретения определенная при помощи *in vitro* анализа с 4-MUF подходящая ферментативная активность полученного рекомбинантного белка I2S составляет по меньшей мере около 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 Е/мг. В некоторых вариантах реализации изобретения определенная при помощи *in vitro* анализа с 4-MUF подходящая ферментативная активность полученного рекомбинантного белка I2S находится в диапазоне, составляющем около 0-50 Е/мг (например, около 0-40 Е/мг, около 0-30 Е/мг, около 0-20 Е/мг, около 0-10 Е/мг, около 2-50 Е/мг, около 2-40 Е/мг, около 2-30 Е/мг, около 2-20 Е/мг, около 2-10 Е/мг, около 4-50 Е/мг, около 4-40 Е/мг, около 4-30 Е/мг, около 4-20 Е/мг, около 4-10 Е/мг, около 6-50 Е/мг, около 6-40 Е/мг, около 6-30 Е/мг, около 6-20 Е/мг, около 6-10 Е/мг). Типовые условия для проведения *in vitro* анализа с 4-MUF приведены ниже. Как правило, при помощи анализа с 4-MUF определяют способность белка I2S осуществлять гидролиз 4-метилумбеллиферил-сульфата (4-MUF-SO<sub>4</sub>) на сульфат и природный флуоресцентный 4-метилумбеллиферил (4-MUF). Одна миллиединица активности соответствует количеству фермента, необходимого для превращения одного наномоля 4-MUF-SO<sub>4</sub> в 4-MUF за одну минуту при 37°C. Как правило, сгенерированные пробными образцами I2S с известной активностью средние единицы флуоресценции (СЕФ) можно использовать для построения стандартной кривой, которую можно применять для расчета ферментативной активности представляющего интерес образца. Затем специфическую активность можно определить, разделив ферментативную активность на концентрацию белка.

В любом примере концентрацию белка в составе, содержащем рекомбинантный I2S, можно определить любым известным в данной области техники подходящим способом для определения концентрации белка. В некоторых случаях концентрацию белка определяют по поглощению ультрафиолетового света. Подобный анализ поглощения обычно проводят на длине волны около 280 нм (A280).

Профиль заряда.

Очищенный рекомбинантный белок I2S можно охарактеризовать ассоциированным с белком профилем заряда. Как правило, профиль заряда белка отражает схему зарядов боковых цепей, которые обычно присутствуют на поверхности белка. Профиль заряда можно определить путем проведения для

белка ионообменной (ИО) хроматографии (например, ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации изобретения "профилем заряда" называют группу величин, представляющих количество белка, элюированного из ионообменной колонки в момент времени после добавления в колонку подвижной фазы, содержащей обменные ионы.

Как правило, подходящей ионообменной колонкой является анионообменная колонка. Например, профиль заряда можно определить при помощи сильной анионообменной хроматографии (САХ), применяя систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В общем случае рекомбинантный I2S адсорбируется на фиксированном положительном заряде сильной анионообменной колонки, а градиент возрастающей ионной силы с применением подвижной фазы с заданной скоростью потока элюирует группы рекомбинантного I2S с колонки пропорционально силе их ионного взаимодействия с положительно заряженной колонкой. Более отрицательно заряженные (более кислые) группы I2S элюируются позже, чем менее отрицательно заряженные (менее кислые) группы I2S. Концентрацию белков в элюате определяют по поглощению ультрафиолетового света (на 280 нм).

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S адсорбируется при значении pH около 8,0 в 20 мМ Трис-HCl на фиксированном положительном заряде колонки Mini Q PE, а градиент возрастающей ионной силы с применением подвижной фазы, содержащей 20 мМ Трис-HCl, 1М хлорид натрия, pH 8,0, со скоростью потока 0,8 мл/мин элюирует группы рекомбинантного I2S с колонки пропорционально силе их ионного взаимодействия с положительно заряженной колонкой.

В некоторых вариантах реализации изобретения профиль заряда может быть подан в виде хроматограммы, иллюстрирующей зависимость единиц поглощения от времени, прошедшего после элюирования с ВЭЖХ-колонки. Хроматограмма может содержать группу из одного или нескольких пиков, где каждый пик в группе соответствует субпопуляции рекомбинантных I2S из состава, которые имеют аналогичные поверхностные заряды.

В некоторых вариантах реализации изобретения профиль заряда для состава, содержащего очищенный белок I2S, характеризуется по меньшей мере шестью пиками. Типовой профиль заряда I2S проиллюстрирован в разделе примеров и на фиг. 11. Как показано на фиг. 11, шесть пиков обозначены (от А до F) в порядке возрастания величины отрицательного заряда и снижения вклада в общую пиковую площадь на хроматограмме. В некоторых вариантах реализации изобретения профиль заряда для состава, содержащего очищенный рекомбинантный белок I2S, характеризуется разным количеством, размером, формой или временными интервалами пиков в зависимости от количества отрицательных или положительных зарядов на поверхности белка. В некоторых вариантах реализации изобретения состав, содержащий рекомбинантный белок I2S, имеет профиль заряда, который характеризуется менее чем 6 (например, менее чем 5, 4, 3 или 2) пиками. В некоторых вариантах реализации изобретения профиль заряда рекомбинантного I2S может иметь 5, 4, 3, 2 или 1 (пик)а. Например, любые один, два, три, четыре или пять пиков А, В, С, D, Е и F могут отсутствовать или быть меньшими по размеру в составе, содержащем очищенный рекомбинантный белок I2S. Как правило, считается, что профиль заряда является более гомогенным в случае меньшего количества пиков.

Картирование гликанов.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S можно охарактеризовать по составу его протеогликанов, а соответствующий способ обычно называют картированием гликанов. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, считается, что гликановые связи вместе с формой и сложностью разветвленной структуры могут влиять на *in vivo* клиренс, лизосомное нацеливание, биодоступность и/или эффективность.

Как правило, карту гликанов можно получить посредством ферментного расщепления и последующего хроматографического анализа. Для ферментного расщепления можно применять различные ферменты, включая, но не ограничиваясь этим, подходящие гликозилазы, пептидазы (например, эндопептидазы, экзопептидазы), протеазы и фосфатазы. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим ферментом является щелочная фосфатаза. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящим ферментом является нейраминидаза. Гликаны (например, фосфогликаны) можно детектировать при помощи хроматографического анализа. Например, фосфогликаны можно детектировать при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (ВЭАОХ-ИАД) или эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Количество гликанов (например, фосфогликанов), представляемое каждым пиком на карте гликанов, можно рассчитать при помощи стандартной кривой гликанов (например, фосфогликанов) в соответствии с известными в данной области техники и раскрытыми в данном документе способами.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный I2S согласно настоящему изобретению характеризуется картой гликанов, содержащей группы из семи пиков, соответствующих нейтральному (группа пиков 1), моносиалированному (группа пиков 2), дисиалированному (группа пиков 3), монофосфорилированному (группа пиков 4), трисиалированному (группа пиков 5), тетрасиалированному (группа пиков 6) и дифосфорилированному (группа пиков 7) белку I2S соответственно. Типовые карты гликанов для I2S проиллюстрированы на фиг. 10. В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный I2S характеризуется картой гликанов, содержащей менее 7 групп пиков (например, кар-

той гликанов с 6, 5, 4, 3 или 2 группами пиков). В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный I2S характеризуется картой гликанов, содержащей более 7 групп пиков (например, 8, 9, 10, 11, 12 или более).

Относительное количество гликанов, соответствующее каждой группе пиков, можно определить на основании площади группы пиков относительно соответствующей площади группы пиков в предопределенном эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения группа пиков 1 (нейтральные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 40-120% (например, около 40-115%, около 40-110%, около 40-100%, около 45-120%, около 45-115%, около 45-110%, около 45-105%, около 45-100%, около 50-120%, около 50-110%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 2 (моносиалированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 80-140% (например, около 80-135%, около 80-130%, около 80-125%, около 90-140%, около 90-135%, около 90-130%, около 90-120%, около 100-140%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 3 (диссиалированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 80-110% (например, около 80-105%, около 80-100%, около 85-105%, около 85-100%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 4 (монофосфорилированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 100-550% (например, около 100-525%, около 100-500%, около 100-450%, около 150-550%, около 150-500%, около 150-450%, около 200-550%, около 200-500%, около 200-450%, около 250-550%, около 250-500%, около 250-450% или около 250-400%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 5 (трисиалированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 70-110% (например, около 70-105%, около 70-100%, около 70-95%, около 70-90%, около 80-110%, около 80-105%, около 80-100% или около 80-95%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 6 (тетрасиалированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 90-130% (например, около 90-125%, около 90-120%, около 90-115%, около 90-110%, около 100-130%, около 100-125% или около 100-120%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В некоторых вариантах реализации изобретения, группа пиков 7 (дифосфорилированные) может характеризоваться площадью группы пиков в диапазоне, составляющем около 70-130% (например, около 70-125%, около 70-120%, около 70-115%, около 70-110%, около 80-130%, около 80-125%, около 80-120%, около 80-115%, около 80-110%, около 90-130%, около 90-125%, около 90-120%, около 90-115%, около 90-110%) относительно соответствующей площади группы пиков в эталонном образце. В данной области техники известно большое количество эталонных образцов для картирования гликанов, которые можно применять для практической реализации настоящего изобретения. Как правило, группа пиков 7 (дифосфорилированные) соответствует уровню ди-М6Р на поверхности очищенного рекомбинантного белка I2S.

Предполагается, что схема гликозилирования очищенного I2S влияет на лизосомное нацеливание. В данной области техники известно большое количество видов анализа *in vitro* клеточного поглощения, которые можно применять для практической реализации настоящего изобретения. Например, для оценки поглощения I2S рецепторами М6Р проводят анализ клеточного поглощения с применением человеческих фибробластов, экспрессирующих со своей поверхности рецепторы М6Р. Количество интернализуемого I2S можно определить по методу ELISA. В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению характеризуется клеточным поглощением, определенным при помощи анализа *in vitro* поглощения, превышающим 70, 75, 80, 85, 90, 95%.

Пептидное картирование.

В некоторых вариантах реализации изобретения можно применять пептидное картирование для характеристики аминокислотного состава, посттрансляционных модификаций и/или клеточного процессинга, такого как отщепление сигнального пептида, преобразование в формилглицин и/или гликозилирование. Как правило, рекомбинантный белок можно разбить на отдельные пептидные фрагменты путем контролируемого или случайного разделения для того, чтобы получить соответствующую схему или пептидную карту. В некоторых случаях перед аналитической оценкой очищенный белок I2S можно сначала подвергнуть ферментному расщеплению. Расщепление перед аналитической оценкой можно проводить, применяя пептидазу, гликозидгидролазу, фосфатазу, липазу или протеазу и/или их комбинации. Структурный состав пептидов можно определить, применяя хорошо известные в данной области техники методы. Типовые способы включают, но не ограничиваются этим, масс-спектрометрию, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или ВЭЖХ.

Процент конверсии в формилглицин.

Для определения процента конверсии в FGly можно применять пептидное картирование. Как обсуждалось выше, для активации I2S необходима конверсия цистеина (соответствующего позиции 59 зрелого человеческого I2S) в формилглицин при помощи формилглицин-образующего фермента (FGE) как

показано ниже:



Следовательно, процент конверсии в формилглицин (%ФГ) можно рассчитать, применяя следующую формулу:

$$\% \text{ФГ (I2S)} = \frac{\text{Количество активных молекул I2S}}{\text{Общее количество (активных + неактивных) молекул I2S}} \times 100$$

Для расчета %ФГ рекомбинантный белок I2S можно расщепить на короткие пептиды при помощи протеаз (например, трипсина или химотрипсина). Короткие пептиды можно разделить и получить их характеристики при помощи, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Можно определить характеристики пептида, в состав которого входит позиция, соответствующая позиции 59 зрелого человеческого I2S, чтобы определить, был ли Cys в позиции 59 преобразован в FGly, по сравнению с контролем (например, белком I2S без конверсии в FGly или белком I2S со 100% конверсией в FGly). На основании соответствующих пиковых площадей можно определить количество пептидов, содержащих FGly (соответствующее количеству активных молекул I2S), и общее количество пептидов, содержащих FGly и Cys (соответствующее общему количеству молекул I2S), и рассчитать соотношение, отображающее %ФГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 77, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 человеческого I2S (SEQ ID NO: 1), преобразованных в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly). В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S согласно настоящему изобретению содержит практически 100% остатков цистеина, соответствующих Cys59 человеческого I2S (SEQ ID NO: 1), преобразованных в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly).

Содержание сиаловой кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения очищенный рекомбинантный белок I2S можно охарактеризовать по составу его сиаловой кислоты. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, считается, остатки сиаловой кислоты в белках могут предотвращать, снижать или подавлять быстрое *in vivo* выведение асиалогликопротеиновыми рецепторами, присутствующими на гепатоцитах. Таким образом, считается, что рекомбинантные белки, которые имеют относительно высоким содержанием сиаловой кислоты, обычно характеризуются относительно длительным временем циркуляции *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации изобретения содержание сиаловой кислоты в очищенном рекомбинантном белке I2S можно определить при помощи хорошо известных в данной области техники способов. Например, содержание сиаловой кислоты в очищенном рекомбинантном белке I2S можно определить при помощи ферментного расщепления и последующего хроматографического анализа. Ферментное расщепление можно проводить при помощи подходящей сиалидазы. В некоторых случаях расщепление проводят ферментом гликозидгидролазы, таким как нейраминидаза. Сиаловую кислоту можно детектировать при помощи хроматографического анализа, такого как, например, высокоэффективная ионообменная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием (ВЭАОХ-ИАД). Количество сиаловой кислоты в составе, содержащем рекомбинантный I2S, можно рассчитать при помощи стандартной кривой сиаловой кислоты в соответствии с известными в данной области техники и раскрытыми в данном документе способами.

В некоторых вариантах реализации изобретения содержание сиаловой кислоты в очищенном рекомбинантном белке I2S может быть большим, чем 16 моль/моль. В контексте сиаловой кислоты единицы "моль/моль" означают количество молей остатков сиаловой кислоты, приходящихся на один моль фермента. В некоторых случаях содержание сиаловой кислоты в рекомбинантном белке I2S выше, чем около 16,5 моль/моль, около 17 моль/моль, около 18 моль/моль, около 19 моль/моль, около 20 моль/моль, около 21 моль/моль, около 22 моль/моль или более. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание сиаловой кислоты в очищенном рекомбинантном белке I2S может соответствовать диапазону около 16-20, 16-21, около 16-22, 16-23, 16-24, около 16-25, около 17-20, 17-21, около 17-22, 17-23, 17-24 или около 17-25 моль/моль.

Фармацевтический состав и введение.

Очищенный рекомбинантный белок I2S можно вводить пациенту с синдромом Хантера в соответствии с известными способами. Например, очищенный рекомбинантный белок I2S может быть доставлен внутривенным, подкожным, внутримышечным, парентеральным, трансдермальным или трансмукозальным (например, оральным или назальным) путем.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав вводят субъекту путем внутривенного введения.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав вводят субъекту путем интратекального введения. Употребляемый в данном документе термин "интратекальное введение" или "интратекальная инъекция" относится к инъекции в спинномозговой канал (интратекальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно применять разные способы, включая, без ограничений, латеральную церебровентрикулярную инъекцию через отверстие бора или цистермальную или поясничную пункцию и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения "интратекальное введение" или "интратекальная доставка" согласно настоящему изобретению относится к ИТ введению или доставке через поясничную область или участок, т.е., поясничному ИТ введению или доставке. Употребляемый в данном документе термин "поясничная область" или "поясничный участок" относится к области между третьим и четвертым поясничными (нижняя часть спины) позвонками и, более точно, к L2-S1 участку позвоночника.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав вводят субъекту путем подкожного (т.е. под кожный покров) введения. В данном случае препарат можно инжектировать при помощи шприца. При этом доступны и другие устройства для введения препарата, такие как устройства для инъекции (например, устройства Inject-ease™ и Genject™); ручки-инъекторы (такие как GenPen™); безыгольные устройства (например, Medijector™ и Biojector™); и подкожные системы доставки на основе пластыря.

В некоторых вариантах реализации изобретения можно применять интратекальное введение совместно с другими способами введения (например, внутривенным, подкожным, внутримышечным, парентеральным, трансдермальным или трансмукозальным (например, оральным или назальным)).

В настоящем изобретении предполагается как одноразовое, так и многократное введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного I2S или содержащего его фармацевтического состава, описанного в данном документе. Рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав можно вводить через регулярные интервалы в зависимости от природы, тяжести и продолжительности болезненного состояния субъекта (например, лизосомной болезни накопления). В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав можно вводить периодически через регулярные интервалы (например, раз в год, раз в шесть месяцев, раз в пять месяцев, раз в три месяца, каждые два месяца (раз в два месяца), ежемесячно (раз в месяц), каждые две недели (раз в две недели), каждую неделю, ежедневно или постоянно).

Рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав можно смешивать с физиологически приемлемым носителем или вспомогательным веществом для получения фармацевтического состава. Носитель и терапевтическое вещество могут быть стерильными. Препарат должен соответствовать способу введения.

Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются этим, солевые растворы (например, NaCl), физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, спирты, глицерол, этанол, гуммиарабик, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, желатин, углеводы, такие как лактозу, амилозу или крахмал, сахара, такие как маннит, цукрозу или другие, декстрозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вазелин, парфюмерное масло, эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.д., а также их комбинации. Фармацевтические препараты при необходимости можно смешивать со вспомогательными веществами (например, лубрикантами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульсификаторами, солями для изменения осмотического давления, буферами, красителями, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т.д.), которые не вступают в нежелательные реакции с активными компонентами или не влияют на их активность. В некоторых вариантах реализации изобретения применяют водорастворимый носитель, подходящий для внутривенного введения.

Состав или лекарственный препарат при необходимости может также содержать небольшие количества смачивающих и эмульсифицирующих агентов либо буферных агентов для изменения pH. Состав может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, препарат замедленного высвобождения или порошок. Также состав может быть изготовлен в виде суппозитория с традиционными связывающими веществами и носителями, такими как триглицериды. Препарат для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как фармацевтической степени чистоты маннит, лактоза, крохмал, стеарат магния, поливинилпирроллидон, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д.

Состав или лекарственный препарат можно изготовить в соответствии со стандартными процедурами в виде фармацевтического состава, подходящего для введения людям. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения состав для внутривенного введения обычно представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости состав также может содержать растворитель и местный анестетик для снижения болевых ощущений в месте инъекции. В общем случае ингредиенты либо добавляют отдельно, либо смешивают вместе в единичной дозировочной форме, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или пакет с указанием количества активного вещества. Если состав предназначен для инфузионного введения, его можно развести в инфузионном флаконе, содержащем стериль-

ную фармацевтической степени чистоты воду, солевой раствор или декстрозу/воду. Если состав предназначен для инъекционного введения, к нему может прилагаться ампула со стерильной водой для инъекции или солевым раствором так, что ингредиенты можно смешивать перед введением.

Употребляемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" определяется, главным образом, на основании общего количества терапевтического вещества, содержащегося в фармацевтических составах согласно настоящему изобретению. В общем случае терапевтически эффективного количества достаточно, чтобы достичь заметного положительного эффекта для пациента (например, лечения, модуляции, исцеления, предотвращения и/или облегчения первопричинного заболевания или болезненного состояния). Например, терапевтически эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для достижения требуемого терапевтического и/или профилактического эффекта, такое как количество, достаточное для модуляции лизосомных ферментных рецепторов или их активности, которая приводит к лечению лизосомной болезни накопления или ее симптомов (например, снижению или исключению появления "пенистых клеток" или клеточной вакуолизации после введения составов согласно настоящему изобретению). В общем случае количество терапевтического вещества (т.е. рекомбинантного лизосомного фермента), водимого нуждающемуся в этом субъекту, зависит от характеристик субъекта. Такие характеристики включают болезненное состояние, тяжесть заболевания, общее состояние здоровья, возраст, пол и массу тела субъекта. Для специалиста в данной области техники не составит труда определить соответствующие дозировки в зависимости от этих и других факторов. Вдобавок, для определения оптимальных диапазонов дозировок можно применять как объективный, так и субъективный анализ.

Терапевтически эффективное количество обычно вводят в режиме дозирования, который может включать многоразовое дозирование. Терапевтически эффективное количество (и/или соответствующая единичная дозировка в рамках эффективного режима дозирования) может варьироваться для каждого конкретного терапевтического белка, например, в зависимости от способа введения или от комбинирования с другими фармацевтическими веществами. Также определенное терапевтически эффективное количество (и/или единичная дозировка) в случае каждого конкретного пациента может зависеть от множества факторов, включая нарушение, лечение которого проводится, и степень тяжести этого нарушения; активность определенного применяемого фармацевтического вещества; определенный применяемый состав; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и образ питания пациента; время введения, способ введения и/или скорость выведения или метаболизма определенного применяемого слитого белка; продолжительность лечения; и тому подобные факторы, что хорошо известно в области техники медицины.

Дополнительные типовые фармацевтические составы и способы введения описаны в публикации согласно РСТ WO 2011/163649 под названием "Способы и составы для ЦНС доставки идуронат-2-сульфатазы" и предварительной заявке № 61/618638 под названием "Подкожное введение идуронат-2-сульфатазы", поданной на регистрацию 30 марта 2012 г., полное содержание которых включено в данный текст посредством ссылки.

Также стоит понимать, что в случае каждого конкретного субъекта соответствующие режимы дозирования должны быть со временем согласованы в соответствии с индивидуальными требованиями и профессиональной оценкой специалиста, осуществляющего применение или контролирующего применение ферментозаместительной терапии, а приведенные в данном документе диапазоны дозировок являются только примерами и не ограничивают объема или практической реализации изобретения.

### Примеры

Пример 1. Захват и процесс очистки рекомбинантного I2S AF.

В этом примере приведен упрощенный процесс прямой очистки, который можно применять для захвата и очистки рекомбинантного I2S, вырабатываемого в бессывороточной среде. Типовая схема очистки проиллюстрирована на фиг. 1.

Разрабатывали клеточную линию, стабильно экспрессирующую фермент идуронат-2-сульфатазы (I2S) и формилглицин-образующий фермент (FGE). Генерация и характеристики типовых клеточных линий описаны в предварительной заявке на патент США под названием "Клетки для получения рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы", поданной на регистрацию одновременно с настоящим документом, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Вкратце, клеточную линию человека создавали для коэкспрессии человеческого белка I2S с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и человеческого формилглицин-образующего фермента (FGE) с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 2

> Полноразмерный предшественник идуронат-2-сульфатазы  
 MPPPRTRGRLLWGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLV  
 RSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSVFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTI  
 PQYFKENGYVTMSVGKVFHHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSEKEYENTKTCRGPDGEL  
 HANLLCPVDVLDVPEGTLDPDKQSTEQAQLLEKMKTSASPFFLA VGYHKPHIPFRYPKEF  
 QKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQRKIRQ  
 SYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVATH  
 VPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGL  
 QVPPRCVPVPSFHVLCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWN  
 SDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMY  
 NDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:5

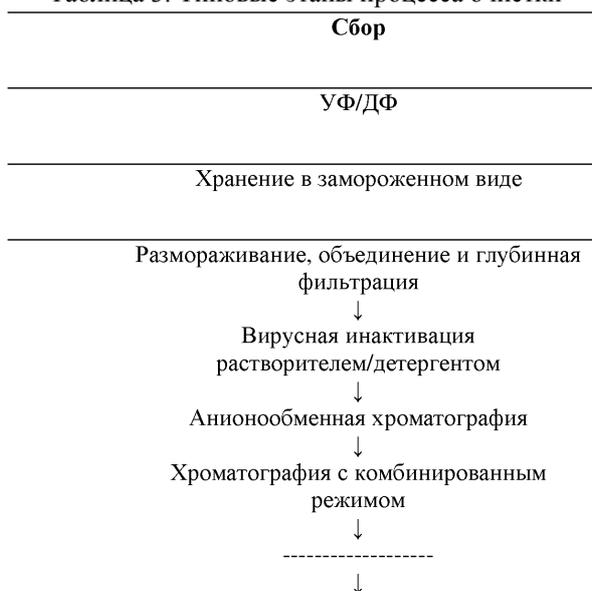
Полноразмерный предшественник человеческого FGE:  
 MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRP  
 GANGSSAAAHRYREANAPGPVPGERQLAHSKMVPPIAGVFTMGTD DPQIKQDGEAPA  
 RRVTIDAFYMDAYEVSNTFEFEKFNSTGYL TEAEKFGDSFVFE GMLSEQVKTNIQQAVA  
 AAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVS WNDAVA YCTWAGKRLPTEAEW  
 EYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGY  
 GLYNIVGNAWEWTSDDWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGG SYMCHR SYCYRYR  
 CAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

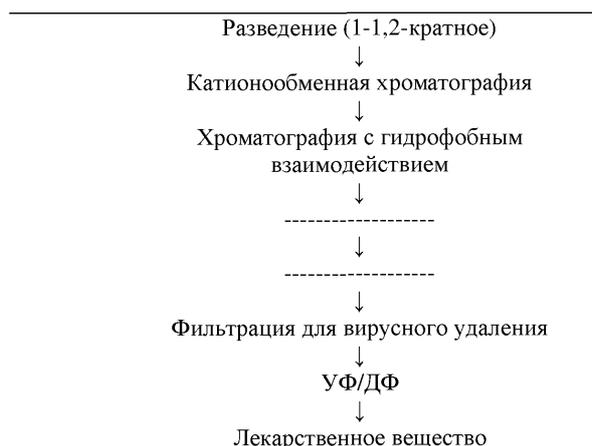
После синтеза полноразмерного фермента I2S удаляли 25-аминокислотный сигнальный пептид, после чего растворимый зрелый фермент I2S секретировался из клетки.

В процессе, проходящем в биореакторе, применяли химически определенную среду (не содержащую сыворотку/не содержащую компоненты животного происхождения; AF).

Каждый индивидуальный материал для сбора уменьшали в объеме и проводили замену буфера при помощи процесса ультрафильтрации/диафильтрации. Каждый отдельный сбор материала, называемого неочищенной массой (НМ), замораживали при  $-50^{\circ}\text{C}$ . Процесс прямой очистки начинался с размораживания и объединения неочищенной массы и включал успешную вирусную инактивацию, этапы анионообменной хроматографии (Carto Q), хроматографии с комбинированным режимом (керамический гидроксипатит), катионообменной хроматографии (SP-сефароза) и хроматографии с гидрофобным взаимодействием (фенил сефароза) с последующей вирусной фильтрацией и этапом конечной концентрации и диафильтрации. В частности, в данном процессе очистки применяли хроматографические методы с применением Q, гидроксипатита, SP и фенила. Хроматографию с протеином G и эксклюзионную хроматографию, традиционно применяемые в процессе очистки I2S, опускали. Типовые этапы приведены в табл. 3.

Таблица 3. Типовые этапы процесса очистки





Степень очистки очищенного белка I2S оценивали посредством пептидного картирования, ДСН-ПААГ (с серебром), эксклюзионной ВЭЖХ. Специфическую ферментативную активность, содержание формилглицина, содержание сиаловой кислоты, карту гликанов, профили зарядов определяли при помощи стандартных способов. Типовые результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Анализ очищенного рекомбинантного белка I2S

Метод анализа		Очищенный I2S (10 Л объем) Мин-Макс (n)
Пептидное картирование	L1	100-105% (n=3)
	L10	98-100% (n=3)
	L12	102-102% (n=3)
	L13	96-97% (n=3)
	L14	102-103% (n=3)
	L17	101-101% (n=3)
	L20	102-103% (n=3)
Белок клетки-хозяина		≤62,5 (n=5)
ДСН-ПААГ (с серебром)		Соответствует
Ионообменная ВЭЖХ	%Пик А	69-69% (n=2)
	%Пик В	20-21% (n=2)
	%Пик Е+F	10-11% (n=2)
Эксклюзионная ВЭЖХ		99,9-99,9% (n=5)
Клеточное поглощение		85, 95% и 97% (n=3)
(биоанализ)		
% формилглицина		87-95% (n=5)
Специфическая активность		62-78 (n=5)
Карта гликанов	Пк грп 3	88-93% (n=5)
	Пк грп 5	72-110% (n=5)
	Пк грп 6	124-133% (n=5)
	Пк грп 7	78-87% (n=5)
	Общая площадь	94-116% (n=5)
Сиаловая кислота		16-22 (n=4)
Эндотоксин		<0,04-<0,05 (n=2)
Бионагрузка		0,00-0,00 (n=2)

Типовая пептидная карта в сравнении с коммерчески доступным контрольным образцом I2S проиллюстрирована на фиг. 2. Результаты типового ДСН-ПААГ-анализа (с серебром) проиллюстрированы на фиг. 3. Как правило, при применении описанного в данном документе способа концентрация БКХ в лекарственном веществе (ЛВ) составляла <100 м.д., что удовлетворяет техническому требованию <100

м.д., общепринятому на многих рынках, включая США. Результат ЭХ для ЛВ составил >99,5%, который также удовлетворяет общепринятому на сегодняшний день на многих рынках техническому требованию >99,3%. Типовой профиль заряда проиллюстрирован на фиг. 4. Типовая карта гликанов проиллюстрирована на фиг. 5. В частности, карта гликанов для очищенного I2S содержит семь групп пиков, элюирующихся в соответствии с увеличением количества отрицательных зарядов, полученных из остатков сиаловой кислоты и маннозо-6-фосфата, и представленных в порядке элюирования: нейтральные, моно-, дисиазированные, монофосфорилированные, трисиазированные и гибридные (моносиазированные и блокированные М6Р), тетрасиазированный и гибридные (дисиазированные и блокированные М6Р) и дифосфорилированные гликаны.

В целом, этот пример демонстрирует, что упрощенный четырехколоночный способ очистки можно успешно применять для очистки рекомбинантного I2S, вырабатываемого в больших масштабах в не содержащей животных компонентов среде.

Пример 2. Исследование стабильности сбора и вирусной инактивации рекомбинантного I2S AF.

Предметом этого исследования была оценка влияния содержания при заданной температуре и циклов замораживания-размораживания на стабильность осветленного сбора рекомбинантного I2S.

Образцы осветленного сбора хранили в условиях внешней среды и при 2-8°C до семи дней, а вирусно-инактивированные образцы НМ содержали в условиях внешней среды до 24 ч. Образцы осветленного сбора для замораживания-размораживания замораживали при -20, -50 и -80°C и проводили до трех циклов замораживания-размораживания. Стабильность оценивали при помощи Вестерн-блоттинга, ЭХ ВЭЖХ и анализа активности.

Материал для сбора I2S-AF получали из клеточной линии 2D при помощи CCPD с применением 20л биореактора В. Вауп с центрифужным ретенционным устройством и заданной скоростью потоков. Для исследования содержания образцов при заданной температуре каждый осветленный сбор хранили в условиях внешней среды и при 2-8°C и брали образцы в выбранные моменты времени. Количественные характеристики образцов и время сбора образцов приведены в табл. 5. Образцы для замораживания-размораживания хранили при -20, -50 и -80°C и размораживали при помощи водяной бани при 25°C.

Таблица 5. Стабильность осветленного сбора в заданные временные точки

	Образцы	Температура содержания	Время содержания (дней)
Осветленный сбор 12	15 x 0,5 мЛ	2-8 °C	T=0, 24 ч, 76 ч, 120 ч, 168 ч
	15 x 0,5 мЛ	Внешней среды	T=0, 24 ч, 76 ч, 120 ч, 168 ч
	9 x 0,5 мЛ	-20 °C, -50 °C и -80 °C	Замораживание/размораживание 1, 2 и 3
Осветленный сбор 18	15 x 0,5 мЛ	2-8 °C	T=0, 24 ч, 76 ч, 120 ч, 168 ч
	15 x 0,5 мЛ	Внешней среды	T=0, 24 ч, 76 ч, 120 ч, 168 ч
	9 x 0,5 мЛ	-20 °C, -50 °C и -80 °C	Замораживание/размораживание 1, 2 и 3

Этап вирусной инактивации происходил на этапе, включающем неочищенную массу, до загрузки первой колонки. НМ получали посредством концентрации и замены буфера осветленного сбора. УФ/ДФ проводили при помощи системы Pall Centramate 1 кв. фут., а буфер меняли на 10 мМ МЭС, 155 мМ NaCl, pH 6,5. На этапе вирусной инактивации проводили добавление 1% Твин 80 и 0,3% ТпВР и фильтрацию при помощи шприцевых фильтров Dugaroge для каждой временной точки. Образцы брали для каждой временной точки из перечисленных в табл. 6 и замораживали при -80°C. Образцы из исследований осветленного сбора в заданные временные точки и исследований с замораживанием-размораживанием исследовали при помощи Вестерн-блоттинга и анализа активности (анализа с 4-MU). Степень очистки образцов НМ на этапе вирусной инактивации определяли при помощи ЭХ ВЭЖХ. В результатах, отображающих активность в заданной временной точке, для Сбора 12 и Сбора 18, приведенных в табл. 5, не наблюдали значительных изменений при содержании их на протяжении 7 дней в условиях внешней среды и при 2-8°C. В активности, регистрируемой для Сбора 12, не наблюдали заметных изменений после 3 циклов замораживания-размораживания и хранения при -20, -50 и -80°C.

Таблица 6. Вирусная инактивация неочищенной массы

	Образцы	Температура содержания	Время содержания (дней)
Вирусная инактивация	9 x 0,5 мЛ	Внешней среды, контроль	T=0, 6 ч, 24 ч
	9 x 0,5 мЛ	Внешней среды, вирусная инактивация	T=0, 6 ч, 24 ч

Активность и результаты ЭХ-ВЭЖХ для стабильности на этапе вирусной инактивации НМ проиллюстрированы на фиг. 6 и 7. На основании данных по активности и степени очистки на протяжении 24 ч показано, что в стабильности вирусной инактивации не было изменений.

Подводя итог, можно сказать, что по результатам описанного в данном документе анализа стабильности, осветленный сбор можно хранить при 2-8°C (например, на протяжении 7 дней) без значительных

изменений качества сбора. Осветленные сборы можно подвергать многократным циклам замораживания-размораживания и хранить при температурах  $-20$ ,  $-50$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  без значительных изменений в стабильности. На основании полученных при помощи ЭХ ВЭЖХ результатов по степени очистки можно сказать, что вирусная инактивация на этапе НМ может происходить при температуре окружающей среды (например, на протяжении 24 ч) без изменений в активности и степени очистки.

Пример 3. Проведение очистки и анализа не содержащей животных компонентов среды IL CD.

Предметом этого исследования было проведение очистки объединенного сбора I2S-AF, полученного из не содержащей животных компонентов химически определенной среды, с применением перфузии и получение характеристик лекарственного вещества.

В этом исследовании оценивали способ проведения очистки I2S-AF и лекарственного вещества (ЛВ), полученных при помощи биореактора, содержащего химически определенную среду.

Клеточная культура.

Материал I2S-AF получали из клеточной линии 2D, экспрессирующей фермент I2S и формилглицин-образующий фермент (FGE), как описано в примере 1. Материал получали в CCPD в 1л биореакторе с центробежным фильтром Das Gir с применением химически определенной бессывороточной среды. Отдельные мешки с каждым осветленным сбором (Н1-21) брали замороженными при  $-20^{\circ}\text{C}$  и размораживали при  $2-8^{\circ}\text{C}$  на протяжении ночи. Одинаковые объемы каждого очищенного сбора объединяли для того, чтобы получить пул полного сбора, затем фильтровали с применением  $0,2$  мкм фильтра и концентрировали при помощи 30 кД кассеты Pall Omega Centramate с общей площадью мембраны  $1$  фут<sup>2</sup>. Неочищенную массу (НМ) перед применением фильтровали с применением  $0,2$  мкм фильтра и замораживали.

Очистка.

Типовые характеристики колонки и загрузки приведены в табл. 7. Q сефарозу загружали при заданном титре 3 г/л. Следующие колонки загружали на 100% относительно элюата из предыдущих колонок, не удаляя материал.

Таблица 7. Характеристики колонок и загрузки

Колонка	Размеры колонки (см x см)	Объем колонки (мл)	Загрузка колонки (г/л смолы I2S)	Загрузка колонки (мг)
Q сефароза	2,6 x 25	133	3	399
НА типа II, 80 мкм	1,6 x 30	60	5,5	330
Фенил сефароза	1,6 x 23	46	5,6	258

Одну очистку проводили для НМ из объединенных сборов 1-21 из биореактора. НМ размораживали при  $2-8^{\circ}\text{C}$  на протяжении ночи и объединяли одинаковые объемы, взятые из каждого сбора.

Отдельные этапы колоночного процесса и составы буферов приведены в табл. 8-11. Объединенную НМ фильтровали при помощи системы бутылочных  $0,2$  мкм фильтров, доводили до pH 6,5 при помощи 1М ацетата натрия, а проводимость доводили до 16 мСм/см при помощи 5М хлорида натрия перед загрузкой в колонку с Q сефарозой FF. Элюат Q сефарозы доводили до  $0,001\text{M NaPO}_4$  при помощи  $0,25\text{M NaPO}_4$ , pH 5,5, и фильтровали при помощи  $0,22$  мкм бутылочного фильтра с PES мембраной перед загрузкой в НА-колонку. Проводимость элюата НА доводили до  $1,55\text{M NaCl}$  при помощи 5М NaCl, а pH доводили до pH 5,5 при помощи 1М ацетата натрия. Время доведения составило приблизительно 1 ч. Доведенный пул фильтровали при помощи  $0,22$  мкм бутылочного фильтра с PES мембраной перед загрузкой в колонку с фенил сефарозой. Фенил-элюат концентрировали 4X и диафильтровали 6X в  $0,02\text{M NaPO}_4$ ,  $0,137\text{M NaCl}$ , pH 6,0. Диафильтрованный продукт доводили до 2,0 г/л и смешивали с 0,2% полисорбатом 20 чтобы получить пробное лекарственное вещество. Для получения дополнительных характеристик создавали пробный пул Н1-20 из НМ.

Таблица 8. Типовые технические детали для хроматографии с Q сефарозой FF

Этап процесса	Скорость потока (см/ч)	ОК	Буферы
Санация	150	3	0,5 N NaOH
Уравновешивание	150	4	0,01 M МЭС, 0,155 M NaCl, ph 6,5
Отмывка 1	150	2	0,01 M МЭС, 0,155 M NaCl, ph 6,5
Отмывка 2	150	3	0,01 M МЭС, 0,155 M NaCl, ph 5,5
Элюирование	150	3	0,01 M МЭС, 0,50 M NaCl, ph 5,5
Очистка/Снятие	150	4	1,0 M NaOH, 2 M NaCl
Хранение	150	4	0,0 N NaOH

Таблица 9. Типовые технические детали для НА-хроматографии

Этап процесса	Скорость потока (см/ч)	ОК	Буферы
Санация	200	3	0,5 N NaOH
Уравновешивание	200	3	0,250 M NaPO <sub>4</sub> , pH 5,5
Отмывка 1	200	3-6	0,01M МЭС, 0,001M NaPO <sub>4</sub> , 0,5M NaCl, pH 5,5
Отмывка 2	200	1	0,01M МЭС, 0,001M NaPO <sub>4</sub> , 0,5M NaCl, pH 5,5
Элюирование	200	6	0,01M МЭС, 0,01M NaPO <sub>4</sub> , 0,5M NaCl, pH 5,5
Санация	200	3	0,01M МЭС, 0,08M NaPO <sub>4</sub> , pH 5,5
Снятие	200	4	0,4M NaPO <sub>4</sub> pH 12
Очистка	200	4	0,5 N NaOH
Хранение	200	4	0,1 N NaOH

Таблица 10. Типовые технические детали для хроматографии с фенил сефарозой

Этап процесса	Скорость потока (см/ч)	ОК	Буферы
Санация	150	3	0,5 N NaOH
Уравновешивание	150	4-6	0,02 M МЭС, 1,5 M NaCl, pH 5,5
Отмывка	150	2	0,02 M МЭС, 1,5 M NaCl, pH 5,5
Элюирование	150	3	0,02 M МЭС, 0,2 M NaCl, pH 5,5
Отмывка водой	150	3	RO/DI Вода
Отмывка этанолом	150	3	20% Этанол
Очистка	150	3	0,5 N NaOH
Хранение	150	3	0,01 N NaOH

Таблица 11. Типовая диафильтрация фенил-элюионного пула

Фильтрационное устройство	Centricon Plus 70
Диафильтрационный буфер	0,02 M NaPO <sub>4</sub> , 0,137 M NaCl, pH 6,0
Объемы диафильтрации	6X-8X

Степень очистки в ходе процесса, определяемая по БКХ при помощи ELISA.

В табл. 12 приведены данные по удалению БКХ на каждом этапе в ходе процесса. Результаты по удалению БКХ в ходе процесса были высокими, а наибольшее удаление происходило на этапе НА.

Таблица 12. Данные по удалению БКХ в ходе процесса

Этап	БКХ (нг/мг)	ЛВУ	Кратность БКХ
Q	46,392	0,3	2
	51,957		
НА	51,957	1,3	18
	5,876		
Фенил	5,876	0,7	5
	1,870		

Характеристики лекарственного вещества.

Результаты для типовой партии лекарственного вещества приведены в табл. 13. Как можно видеть, в очищенном материале лекарственное вещество обладает высокой специфической активностью и %ФГ. Типовые характеристики лекарственного вещества приведены в табл. 13. Содержание БКХ было уменьшено от 1870 до 372 нг/мг на конечном УФ/ДФ этапе.

Таблица 13. Типовая партия лекарственного вещества

Партия ЛВ	1 Л CD среда (I2S-AF)
%ФГ	94%
Карта гликанов	
Группа 3	99%

Группа 5	89%
Группа 6	104%
Группа 7 (2-М6Р)	95%
Общая площадь	107%
Сиаловая кислота	17
Интернализация	83%
ЭХ-ВЭЖХ	99,9%
Специфическая активность (Е/мг)	82
ИО ВЭЖХ	
А (%)	64%
В (%)	23%
А+В	87%
Е+F	0%
Белок клетки-хозяина	372
Клеточное поглощение	98

Пример 4. Физико-химические и биологические характеристики рекомбинантного фермента I2S.

Целью данного примера было получение детальных характеристик рекомбинантного белка I2S, очищенного вышеописанными способами.

ДСН-ПААГ.

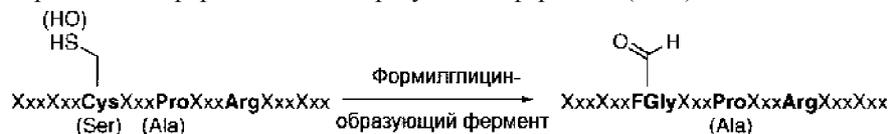
Для данного эксперимента рекомбинантный белок получали, применяя человеческие клеточные линии 2D и 4D в двух отдельных бессывороточных клеточных культуральных реакциях. Образцы собирали и очищали при помощи вышеописанных способов. Очищенный фермент I2S анализировали при помощи ДСН-ПААГ и обрабатывали серебряным красителем для визуализации. Типовые результаты проиллюстрированы на фиг. 8. Как видно из фиг. 8, схемы полос для рекомбинантного белка I2S, очищенного вышеописанными способами, сравнимы с контрольным образцом I2S, очищенным стандартным способом.

Пептидная карта.

Рекомбинантный белок I2S, полученный из клеточной линии I2S-AF 2D, очищали при помощи вышеописанных способов. Образец очищенного рекомбинантного I2S и контрольный образец человеческого I2S подвергали протеолитическому расщеплению и исследовали при помощи ВЭЖХ-анализа. Типовая пептидная карта в сравнении с соответствующей картой для контрольного I2S проиллюстрирована на фиг. 9.

Процент конверсии в формилглицин.

Для определения процента конверсии в FGly можно применять пептидное картирование. Для активации I2S необходима конверсия цистеина (соответствующего позиции 59 зрелого человеческого I2S) в формилглицин при помощи формилглицин-образующего фермента (FGE) как показано ниже:



Следовательно, процент конверсии в формилглицин (%ФГ) можно рассчитать, применяя следующую формулу:

$$\% \text{ФГ (I2S)} = \frac{\text{Количество активных молекул I2S}}{\text{Общее количество (активных + неактивных) молекул I2S}} \times 100$$

Например, 50% ФГ означает то, что половина очищенного рекомбинантного I2S ферментативно неактивна и не оказывает терапевтического эффекта.

Для расчета %ФГ применяли пептидное картирование. Вкратце, рекомбинантный белок I2S расщепляли на короткие пептиды при помощи протеаз (например, трипсина или химотрипсина). Короткие пептиды разделяли и получали их характеристики при помощи ВЭЖХ. Пептид, в состав которого входит позиция, соответствующая позиции 59 зрелого человеческого I2S, выбирали, чтобы определить, был ли Cys в позиции 59 преобразован в FGly, по сравнению с контролем (например, белком I2S без конверсии в FGly или белком I2S со 100% конверсией в FGly). На основании соответствующих пиковых площадей можно определить количество пептидов, содержащих FGly (соответствующее количеству активных молекул I2S), и общее количество пептидов, содержащих FGly и Cys (соответствующее общему количеству молекул I2S), и рассчитать соотношение, отображающее %ФГ. Типовые результаты приведены в табл. 14.

Карта гликанов - содержание маннозо-6-фосфата и сиаловой кислоты.

Проводили определение состава гликанов и сиаловой кислоты для очищенного рекомбинантного белка I2S. Количественную оценку состава гликанов проводили при помощи анионообменной хроматографии. Как описано ниже, карта гликанов рекомбинантного I2S, очищенного в описанных в данном документе условиях, состоит из семи пиковых групп, элюирующихся в соответствии с возрастанием количества отрицательных зарядов, по меньшей мере, частично принадлежащих гликоформам сиаловой кислоты и маннозо-6-фосфата, полученных в результате ферментного расщепления. Вкратце, очищенный рекомбинантный I2S из бессывороточной клеточной культуры (бессывороточная I2S-AF 2D и бессывороточная I2S-AF 4D) и контрольный рекомбинантный I2S обрабатывали (1) очищенным ферментом нейраминидазой (выделенной из *Arthrobacter Ureafaciens* (10 мЕ/мкл), Roche Biochemical (Индианаполис, Индиана), Cat. # 269 611 (1 Е/100 мкл)) для удаления остатков сиаловой кислоты, (2) алкалинфосфатазой на протяжении 2 ч при 37±1°C для полного высвобождения остатков маннозо-6-фосфата, (3) алкалинфосфатазой + нейраминидазой или (4) не проводили обработку. Каждое ферментативное расщепление анализировали при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (ВЭАХ-ИАД), применяя аналитическую колонку CarboPac PA1 с предколонкой Dionex CarboPac PA1. В каждом анализе применяли эталонные группы сиаловой кислоты и маннозо-6-фосфата в диапазоне, составляющем от 4,0 до 2,0 нмоль.

Применяли изократический метод с использованием 48 мМ ацетата натрия в 100 мМ гидроксида натрия на протяжении как минимум 15 мин при скорости потока 1,0 мл/мин при внешней температуре колонки для элюирования каждого пика. Данные, полученные для каждого отдельного этапа для образцов I2S-AF и контрольного I2S, объединяли на одной хроматограмме, чтобы получить карту гликанов для каждого соответствующего рекомбинантного белка. Как проиллюстрировано на фиг. 10, на типовой карте гликанов для I2S, очищенного из бессывороточной среды, представлены типичные элюционные пики (в порядке элюирования), соответствующие нейтральным, моно-, дисиалированным, монофосфорилированным, трисиалированным и гибридным (моносиалированным и кэпированному маннозо-6-фосфату), тетрасиалированным и гибридным (дисиалированным и кэпированному маннозо-6-фосфату) и дифосфорилированным гликанам. Типовые карты гликанов проиллюстрированы на фиг. 10.

Среднее содержание сиаловой кислоты (количество молей сиаловой кислоты, приходящееся на один моль белка) для каждого образца рекомбинантного I2S рассчитывали из линейно-регрессионного анализа стандартных значений для сиаловой кислоты. Каждую полученную хроматограмму визуализировали при помощи программного обеспечения PeakNet 6. Стандартные значения для сиаловой кислоты, значения для сиаловой кислоты, выделенной из контрольного рекомбинантного I2S и исследуемых образцов, находятся в одном пике. Количество сиаловой кислоты (в нмолях) для I2S рассчитывали как исходную величину при помощи следующей формулы:

$$С.К. (молей на моль I2S) = \frac{(нмолей сиаловой кислоты)}{(0,3272)(C)}$$

где С - концентрация белка (мг/мл) в образце или контрольном образце рекомбинантного I2S.

Скорректированную величину для сиаловой кислоты в молях сиаловой кислоты на один моль белка для каждого исследуемого образца рассчитывали, применяя следующую формулу:

$$Скорректированное значение для С.К. = \frac{\left( \frac{Исходное значение для сиаловой кислоты}{Установленное значение для идурсульфазы} \right) \times \left( \frac{Установленное значение для идурсульфазы}{Исходное значение для идурсульфазы} \right)}$$

Типовые данные, представляющие содержание сиаловой кислоты в рекомбинантном I2S, очищенном из клеточных линий I2S-AF 2D или 4D, приведены в табл. 14.

Таблица 14. Типовые характеристики рекомбинантного I2S, очищенного из бессывороточной клеточной культуры

Анализ	I2S-AF 2D (бессывороточная)
<b>Пептидное картирование</b>	
L1	101
L10	100
L12	102
L13	97
L14	101
L17	100
L20	102
<b>Белок клетки-хозяина</b>	< 62,5 нг/мг
<b>Ионообменная ВЭЖХ % Площадь</b>	
Пик А	62
Пик А+В	82
Пик Е+F	0
<b>% Формилглицина</b>	87
<b>Специфическая активность (Е/мг) (анализ выделения сульфата)</b>	64
<b>% Эксклюзионная ВЭЖХ</b>	≥ 99,8 (n=13)
<b>Картирование гликанов</b>	
Моносиализированные	105
Дисаилированные	93
Монофосфорилированные	139
Трисиализированные	89
Тетрасаилированные	125
Дифосфорилированные	95
<b>Сигнальная кислота (моль/моль)</b>	20

Специфическая активность.

Специфическую активность рекомбинантного фермента I2S, очищенного описанными в документе способами, анализировали при помощи *in vitro* анализа выделения сульфата или анализа с 4-MUF.

*In vitro* анализ выделения сульфата.

*In vitro* анализ активности выделения сульфата проводили, применяя в качестве субстрата гепарин дисахарид. В частности, в этом методе определяют способность I2S высвобождать сульфат-ионы из субстрата природного происхождения - гепарин дисахарид. Количество высвобожденного сульфата можно определить при помощи ионной хроматографии с применением детектора по проводимости. Вкратце, сначала образцам заменяли буфер на 10 мМ ацетата Na, pH 6, для устранения подавления фосфат-ионами в буферной смеси. Затем образцы разводили до 0,075 мг/мл реакционным буфером (10 мМ ацетата Na, pH 4,4) и инкубировали на протяжении 2 ч при 37°C с гепарин дисахаридом при соотношении фермента и субстрата, соответствующем 0,3 мкг I2S/100 мкг субстрата, в 30 мкл реакционном объеме. Затем реакцию останавливали путем нагревания образцов при 100°C на протяжении 3 мин. Анализ проводили, применяя аналитическую колонку Dionex IonPac AS18 с предколонкой IonPac AG18. Применяли ионохроматографический метод с 30 мМ гидроксида калия при 1,0 мл/мин на протяжении 15 мин. Количество сульфата, высвобожденного образцом I2S, рассчитывали, применяя линейно-регрессионный анализ сульфатных проб в диапазоне от 1,7 до 16,0 нмоль. Фиксируемую величину выражали в единицах на мг белка, где 1 единица соответствует 1 мкмоль сульфата, выделяемого в час, а концентрацию белка определяли при помощи измерений A280. Типовые результаты приведены в табл. 14.

Анализ с 4-MUF.

Специфическую активность рекомбинантного фермента I2S также можно анализировать при помощи флуоресцентного анализа с 4-MUF. Вкратце, в данном анализе оценивают гидролиз субстрата I2S - 4-метилумбеллиферил-сульфата (4-MUF-SO<sub>4</sub>). После расщепления субстрата 4-MUF-SO<sub>4</sub> I2S молекула преобразуется в сульфат и природный флуоресцентный 4-метилумбеллиферил (4-MUF). В результате ферментативную активность I2S можно определить, оценивая общее изменение флуоресцентного сигнала со временем. В этом эксперименте очищенный белок I2S инкубировали с раствором 4-метилумбеллиферил-сульфата (4-MUF-SO<sub>4</sub>), солью калия, Sigma Cat. # M-7133). Калибровку в данном анализе проводили, используя группы контрольных образцов, содержащих коммерчески доступный фермент I2S, разведенный в маточном растворе в соотношении 1:100, 1:200 и 1:20000. Ферментный анализ проводили при 37°C при помощи откалиброванного флуорометра. Используя значения флуоресценции, полученные для каждого эталонного образца, процентный коэффициент вариации определяли при помощи следующего выражения:

$$\%KB = \frac{\text{Стандартное отклонение исходного значения флуоресценции (N = 3)}}{\text{Среднее значение флуоресценции}} \times 100\%$$

Затем процентные значения KB применяли для расчета скорректированной средней флуоресценции для каждого образца для того, чтобы определить регистрируемую ферментативную активность, выраженную в мЕ/мл, при помощи следующей формулы:

$$mE / mL = (SEF) \left( \frac{1 \text{ нмоль} / L}{10 \text{ ЕФ}} \right) \left( \frac{1L}{10^3 \text{ mL}} \right) \left( \frac{2,11 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ час}}{60 \text{ мин}} \right) \left( \frac{1 \text{ мЕ}}{\text{нмоль}} \right) (KP)$$

SEF - отрицательная скорректированная средняя флуоресценция KP - кратность разведения.

Одна миллиединица активности соответствует количеству фермента, необходимого для превращения одного наномоля 4-метилумбеллиферил-сульфата в 4-метилумбеллиферил за одну минуту при 37°C.

Профиль заряда.

В этом эксперименте определяли распределение заряда для каждого очищенного рекомбинантного I2S при помощи сильной анионообменной хроматографии (САХ), применяя систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В данном способе варианты рекомбинантного I2S в образце разделяют на основании различий в поверхностных зарядах. При значении pH 8,00 отрицательно заряженные группы адсорбируются на фиксированном положительном заряде САХ-колонки. Для того чтобы элюировать каждую группу белков пропорционально силе их ионного взаимодействия с колонкой, применяют градиент возрастающей ионной силы. Сто микрограммов очищенного I2S, выделенного из клеточной линии 2D в бессывороточных условиях роста, или контрольный рекомбинантный фермент I2S загружали в колонку Amersham Biosciences Mini Q PE (4,6×50 мм), которую держали при температуре окружающей среды, и уравнивали 20 мМ Трис-НСl, pH 8,00. Градиентное элюирование осуществляли при скорости потока 0,80 мл/мин, применяя подвижную фазу 20 мМ Трис-НСl, 1,0М хлорида натрия, pH 8,00. Концентрацию белка определяли непрерывно в ходе эксперимента, измеряя поглощение света элюированного образца на длине волны 280 нм. Типовые результаты, иллюстрирующие профили зарядов, которые наблюдали для рекомбинантного I2S, выделенного из клеточных линий 2D и 4D, приведены на фиг. 11.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав для лечения синдрома Хантера, содержащий очищенную рекомбинантную идуронат-2-сульфатазу (I2S), имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 1, при этом по меньшей мере 70% указанной очищенной рекомбинантной I2S имеют остаток цистеина, соответствующий Cys59 в SEQ ID NO: 1, преобразованный в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly), и менее чем 150 нг/мг белка клетки-хозяина (БКХ).

2. Состав для лечения синдрома Хантера, содержащий очищенную рекомбинантную идуронат-2-сульфатазу (I2S), имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 1, при этом по меньшей мере 70% указанной очищенной рекомбинантной I2S имеют остаток цистеина, соответствующий Cys59 в SEQ ID NO: 1, преобразованный в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly), и от 10 до 150 нг/мг белка клетки-хозяина (БКХ).

3. Состав по любому из п.1 или 2, имеющий менее 100 нг/мг или менее 80 нг/мг белка клетки-хозяина (БКХ).

4. Состав по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что в очищенном рекомбинантном I2S по меньшей мере 75% или по меньшей мере 85% остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO: 1, преобразовано в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly).

5. Состав по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанная аминокислотная последовательность по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1.

6. Состав по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанная аминокислотная последовательность является идентичной SEQ ID NO: 1.

7. Состав по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что очищенный рекомбинантный белок I2S содержит по меньшей мере 20% или по меньшей мере 50% бис-фосфорилированных олигосахаридов на молекулу.

8. Состав по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что очищенный рекомбинантный белок I2S в среднем содержит по меньшей мере 16 сиаловых кислот на молекулу.

9. Состав по любому из пп.1-8, характеризующийся:

(а) специфической активностью, составляющей по меньшей мере 40 Е/мг, по меньшей мере 50 Е/мг или по меньшей мере 60 Е/мг, определенной при помощи *in vitro* анализа активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида, или

(б) специфической активностью, составляющей по меньшей мере по меньшей мере 20 Е/мг, по меньшей мере 30 Е/мг, по меньшей мере 40 Е/мг, по меньшей мере 50 Е/мг, по меньшей мере 60 Е/мг, определенной при помощи *in vitro* анализа превращения 4-MUF-SO<sub>4</sub> в 4-MUF.

10. Состав по любому из пп.1-9, характеризующийся интернализацией в клетку, составляющей бо-

лее чем 70, 75, 80, 85, 90, 95%, определенной при помощи *in vitro* анализа поглощения с использованием клеток, содержащих рецептор МР6, причем эти клетки необязательно могут представлять собой фибробласты.

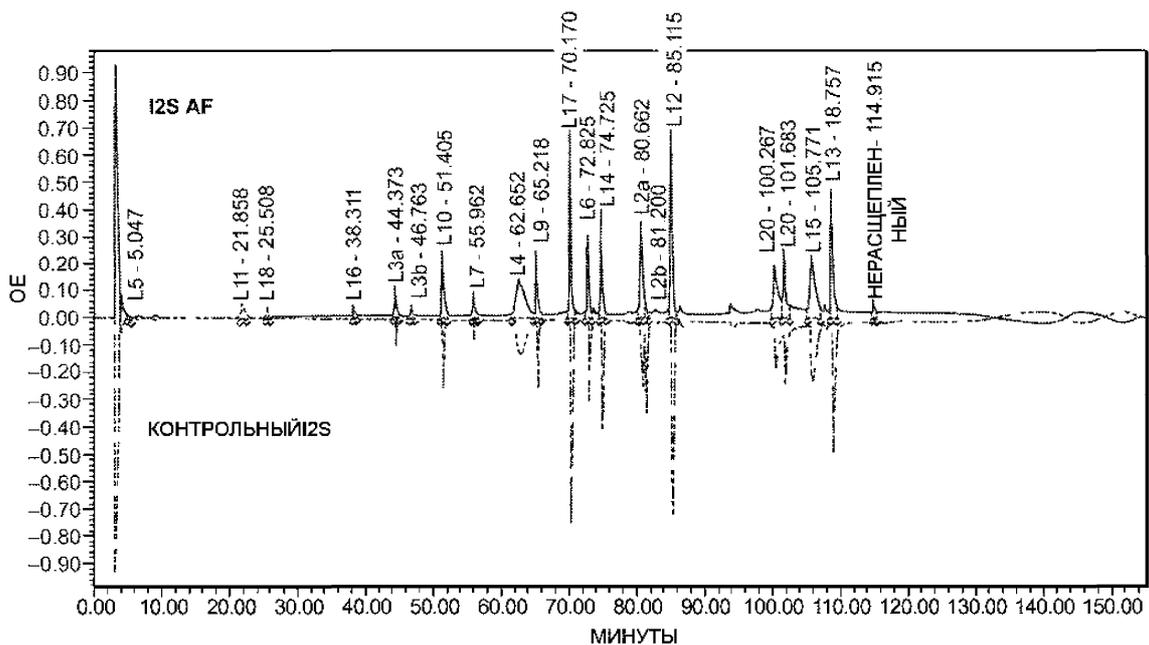
11. Состав по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что очищенный рекомбинантный I2S дополнительно характеризуется картой гликанов, содержащей семь или менее групп пиков, выбранных из групп пиков, соответствующих нейтральному (группа пиков 1), моносиалированному (группа пиков 2), дисиалированному (группа пиков 3), монофосфорилированному (группа пиков 4), трисиалированному (группа пиков 5), тетрасиалированному (группа пиков 6) или дифосфорилированному (группа пиков 7) белку I2S.

12. Препарат для лечения синдрома Хантера, содержащий состав по любому из пп.1-11 и физиологически приемлемый носитель.

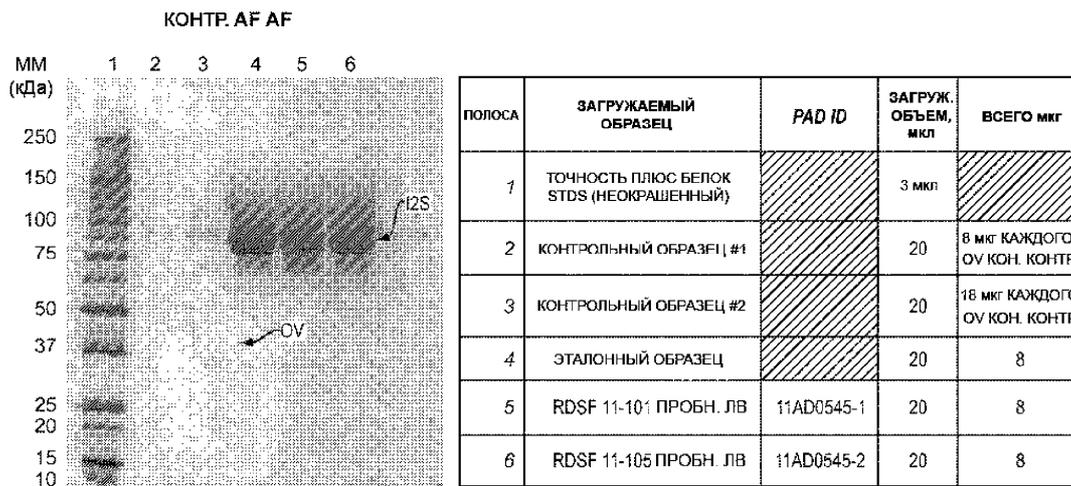
13. Препарат по п.12, характеризующийся тем, что указанный препарат подходит для внутривенного введения, интратекального введения или подкожного введения.



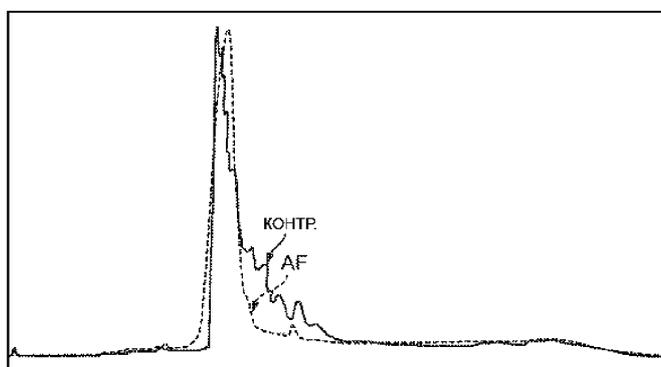
Фиг. 1



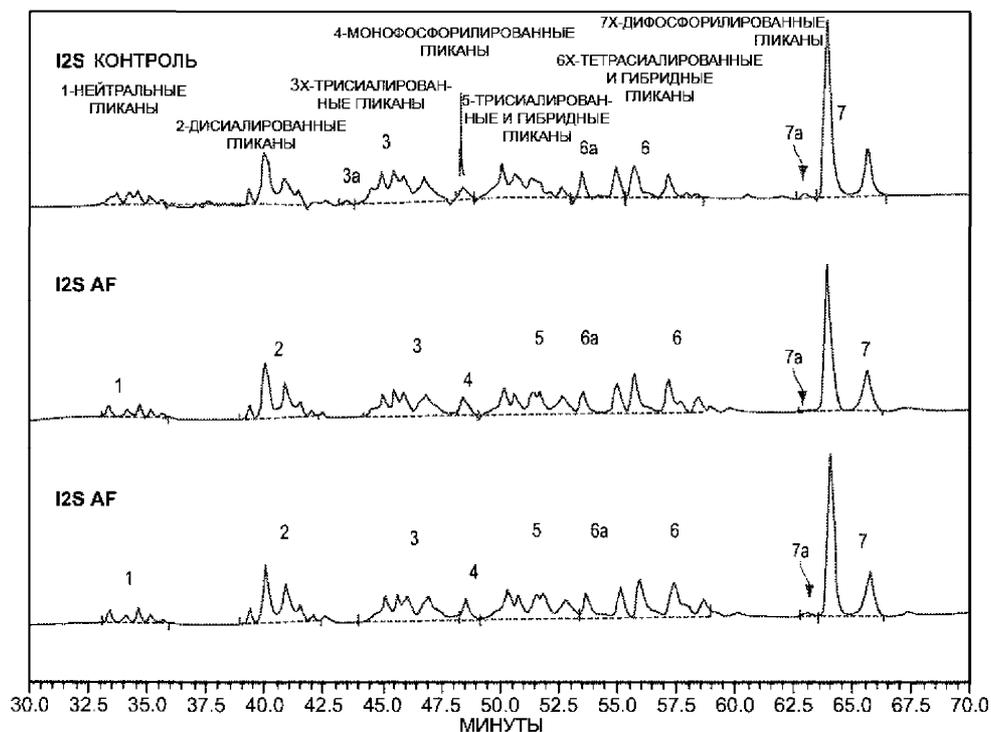
Фиг. 2



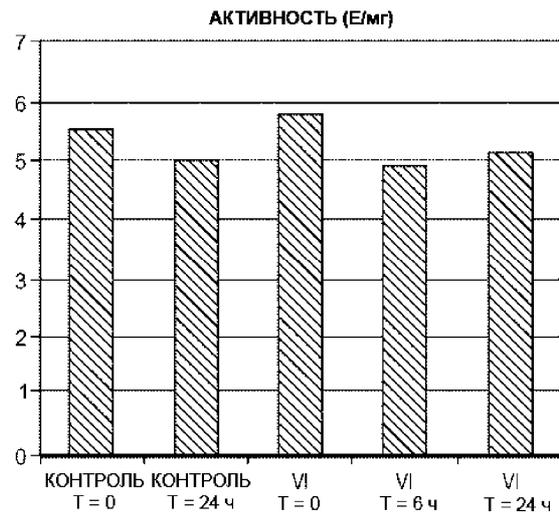
Фиг. 3



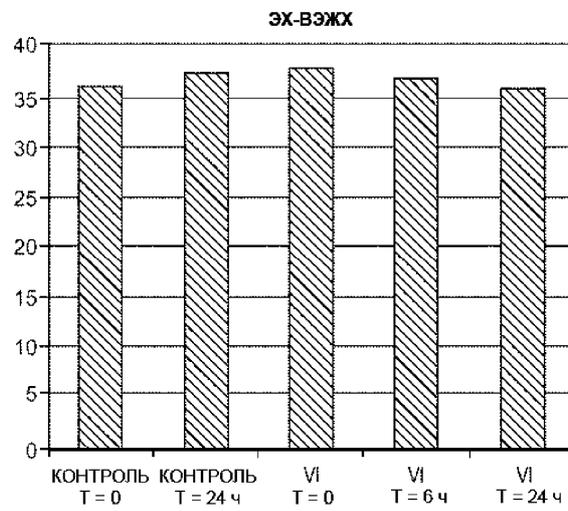
Фиг. 4



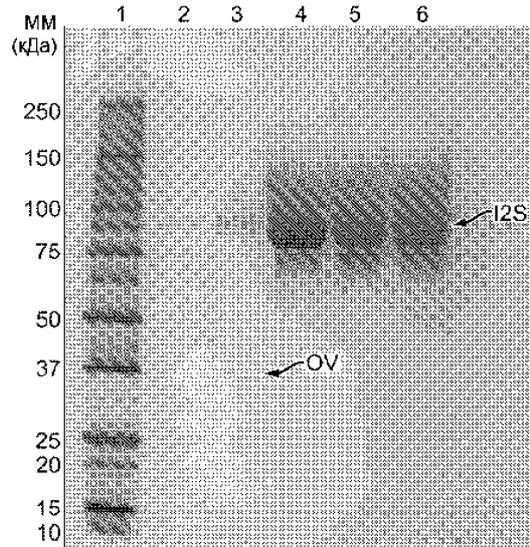
Фиг. 5



Фиг. 6

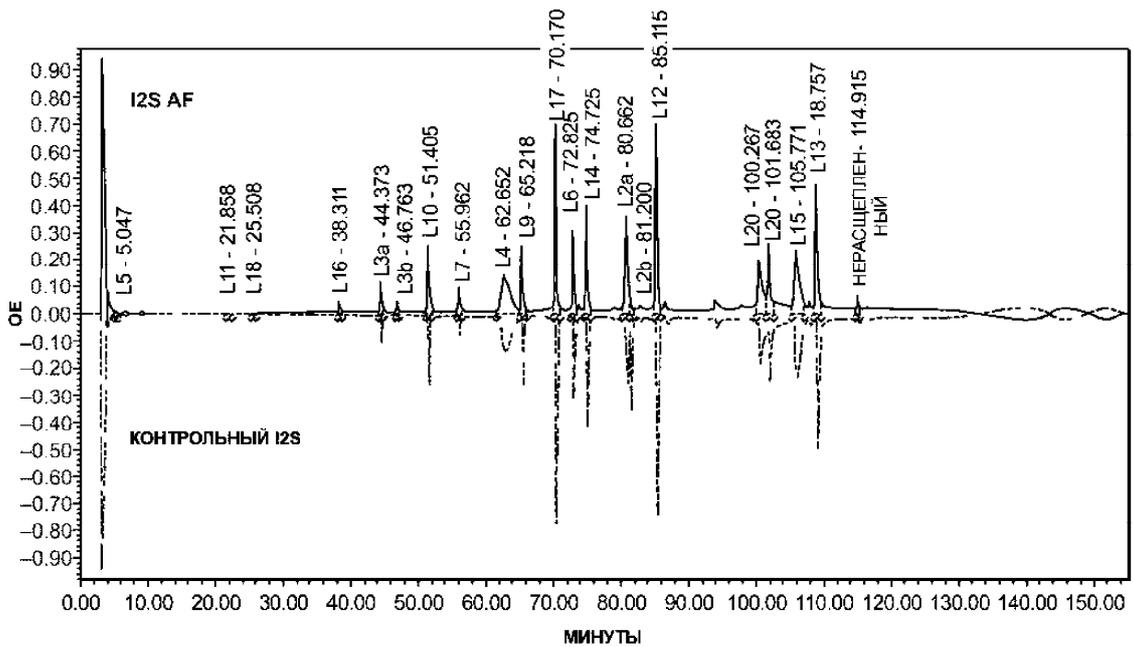


Фиг. 7

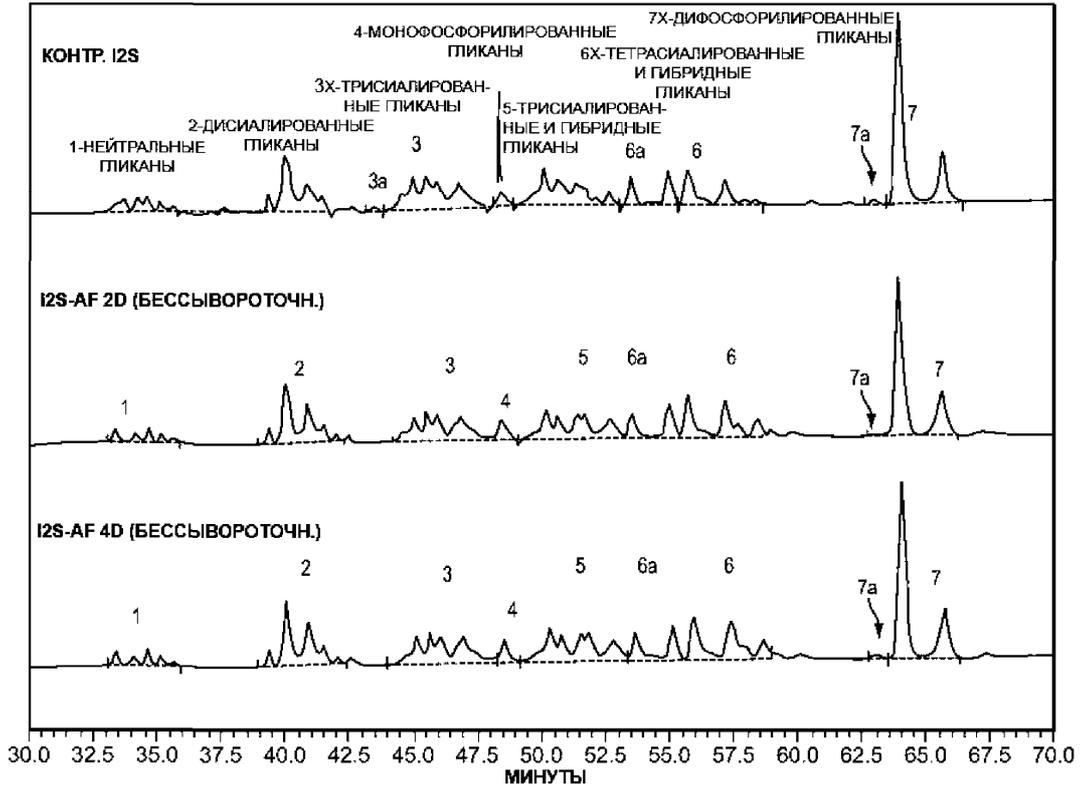


ПОЛО- СА	ЗАГРУЖАЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ	ЗАГРУЖ. ОБЪЕМ	ВСЕГО МКГ
1	БЕЛОК STDS	3 МКЛ	
2	КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ #18	20 МКЛ	МКГ
3	КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ #2	20 МКЛ	16 МКГ
4	ЭТАЛОННЫЙ ОБРАЗЕЦ I2S	20 МКЛ	8 МКГ
5	БЕССЫВОРОТОЧНАЯ КУЛЬТУРА I2S-AF 2D	20 МКЛ	8 МКГ
6	БЕССЫВОРОТОЧНАЯ КУЛЬТУРА I2S-AF 4D	20 МКЛ	8 МКГ

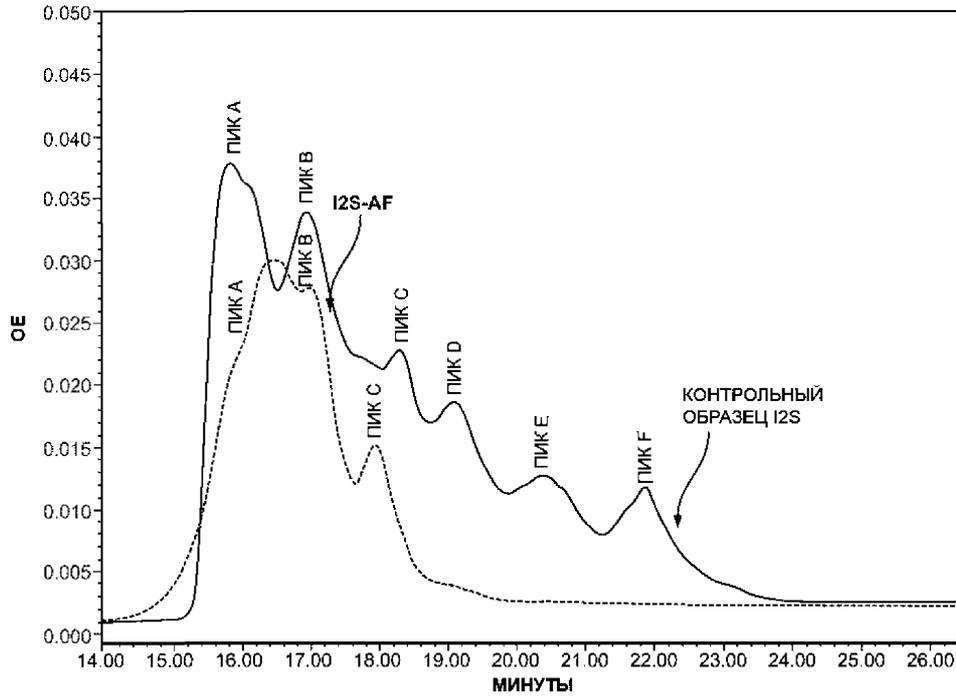
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2