

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090805** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.11.30**

(51) Int. Cl. *C12N 9/16* (2006.01)  
*C12N 15/85* (2006.01)  
*C12P 21/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2013.06.28**

---

(54) **КЛЕТКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ**

---

(31) **61/666,719**

(72) Изобретатель:

(32) **2012.06.29**

**Болдог Ференс, Хартлейн Майкл (US)**

(33) **US**

(62) **201492183; 2013.06.28**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Нилова М.И. (RU)**

**ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК  
ТЕРАПИС, ИНК. (US)**

---

(57) В настоящем изобретении, среди прочего, предложены способы и композиции для получения рекомбинантного белка I2S с улучшенными эффективностью и активностью при помощи клеток, коэкспрессирующих белок I2S и FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы одновременно сверхэкспрессировать рекомбинантные белки I2S и FGE. Клетки согласно изобретению адаптируемы ко многим условиям клеточного культивирования. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно настоящему изобретению адаптируемы к суспензионному бессывороточному культивированию в больших масштабах.

**A1**

**202090805**

**202090805**

**A1**

## КЛЕТКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 61/666719, поданной 29 июня 2012 г., которая в полном объеме включена в данную заявку посредством ссылки.

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** Настоящее изобретение ссылается на Перечень последовательностей, поданный в электронной форме в виде файла ASCII .txt под названием “2006685-00340\_SEQ\_LIST” 27 июня 2013 г. Файл .txt был создан 25 июня 2013 г., его размер составляет 25 КБ. Полное содержание Перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** 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.

**[0004]** 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.

**[0005]** 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

**[0006]** В изобретении, среди прочего, предложены усовершенствованные способы и составы для получения рекомбинантного белка I2S, который делает возможной более эффективную ферментозаместительную терапию при синдроме Хантера. Настоящее изобретение включает открытие, что более эффективный рекомбинантный белок I2S можно получить при помощи клеток млекопитающих, сконструированных таким образом, чтобы они коэкспрессировали рекомбинантный белок I2S и формилглицин-образующий фермент (FGE). Неожиданно рекомбинантный белок I2S, полученный при помощи таких сконструированных клеток, характеризуется необычно высоким уровнем процента конверсии в C $\alpha$ -формилглицин (FGly) (например, более 70% и вплоть до 100%), что приводит к значительному улучшению ферментативной активности рекомбинантного белка I2S. Кроме того, клетки млекопитающих, коэкспрессирующие белки I2S и FGE в соответствии с настоящим изобретением, были успешно адаптированы для выращивания в суспензионной культуре в больших масштабах. Следовательно, настоящее изобретение обеспечивает возможность более эффективного получения высокоактивного рекомбинантного белка I2S в больших масштабах.

**[0007]** Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок идуронат-2-сульфатазы (I2S), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO:1; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок формилглицин-образующего фермента (FGE), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO:5, при этом первая и/или вторая нуклеиновая кислота являются экзогенными, а клетка при культивировании в условиях клеточного культивирования (например, в суспензионной или адгезивной культуре) вырабатывает белок I2S, содержащий по меньшей мере около 70% (например, по меньшей мере около

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в С $\alpha$ -формилглицин (FGly).

**[0008]** В другом аспекте в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок идуронат-2-сульфатазы (I2S), имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO:1; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок формилглицин-образующего фермента (FGE), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO:5, при этом первая и/или вторая нуклеиновая кислота являются экзогенными, а клетка при культивировании в условиях клеточного культивирования вырабатывает белок I2S, содержащий по меньшей мере около 50% (например, по меньшей мере около 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в С $\alpha$ -формилглицин (FGly), при уровне удельной продуктивности большем, чем около 10 пикограммов/клетку/день (например, большем, чем около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 пикограммов/клетку/день).

**[0009]** В некоторых вариантах реализации изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует белок I2S, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая нуклеиновая кислота кодирует белок FGE, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:5.

**[0010]** В некоторых вариантах реализации изобретения первая и/или вторая нуклеиновая кислота функционально связана с промотором hCMV.

**[0011]** В некоторых вариантах реализации изобретения первая и/или вторая нуклеиновая кислота являются кодон-оптимизированными. В некоторых вариантах реализации изобретения первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичную SEQ ID NO:7. В конкретных вариантах реализации изобретения первая нуклеиновая кислота содержит последовательность SEQ ID NO:7.

**[0012]** В некоторых вариантах реализации изобретения вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по

меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичную SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, идентичную SEQ ID NO:8.

**[0013]** В некоторых вариантах реализации изобретения и первая, и вторая нуклеиновые кислоты являются экзогенными (также называемыми рекомбинантными). В некоторых вариантах реализации изобретения первая и/или вторая нуклеиновые кислоты интегрированы (например, стабильно) в геном клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и/или вторая нуклеиновые кислоты находятся в одной или более внехромосомных конструкций.

**[0014]** В некоторых вариантах реализации изобретения клетка согласно настоящему изобретению является клеткой млекопитающего. В определенных вариантах реализации изобретения подходящая клетка млекопитающего является клеткой человека. В конкретных вариантах реализации изобретения подходящая клетка млекопитающего является клеткой СНО.

**[0015]** В некоторых вариантах реализации изобретения клетка согласно изобретению является адаптируемой к суспензионной культуре. В других вариантах реализации изобретения клетка согласно изобретению является адгезивной.

**[0016]** В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения рекомбинантного белка идуронат-2-сульфатазы (I2S) путем культивирования клетки, описанной в различных приведенных в данном тексте вариантах реализации изобретения, в таких условиях, что рекомбинантные белки I2S и FGE коэкспрессируются в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения клетку культивируют в больших масштабах. В некоторых вариантах реализации изобретения большие масштабы, подходящие для настоящего изобретения, соответствуют процессу, проходящему в биореакторе. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор, подходящий для настоящего изобретения, имеет объем, выбранный из 10Л, 200Л, 500Л, 1000Л, 1500Л, 2000Л. В некоторых вариантах реализации изобретения процесс, соответствующий большим масштабам (например, в биореакторе), подходящий для настоящего изобретения, включает процесс перфузии. В некоторых вариантах реализации изобретения процесс, соответствующий большим масштабам (например, в биореакторе), подходящий для настоящего изобретения, включает использование периодической культуры. В некоторых вариантах реализации изобретения процесс, соответствующий большим масштабам, подходящий для настоящего изобретения, представляет собой процесс, проходящий в роллерном флаконе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетку согласно

настоящему изобретению культивируют в суспензии. В других вариантах реализации изобретения клетку согласно настоящему изобретению культивируют адгезивно.

**[0017]** В некоторых вариантах реализации изобретения клетку согласно настоящему изобретению культивируют в бессывороточной среде (например, в среде неживотного происхождения, химически определенной или безбелковой среде). В других вариантах реализации изобретения клетку согласно настоящему изобретению культивируют в содержащей сыворотку среде.

**[0018]** В различных вариантах реализации изобретения способ согласно изобретению дополнительно включает этап очистки рекомбинантного белка I2S.

**[0019]** В другом аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный белок идуронат-2-сульфатазы (I2S), полученный при помощи клетки или способа, описанных в приведенных в данной заявке различных вариантах реализации изобретения.

**[0020]** В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложен способ получения рекомбинантного белка идуронат-2-сульфатазы (I2S), в котором указанный рекомбинантный белок I2S имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичную SEQ ID NO:1; и содержащий по меньшей мере около 70% (например, по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в C<sub>α</sub>-формилглицин (FGly). В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок I2S характеризуется специфической активностью, составляющей по меньшей мере около 20 Е/мг, 30 Е/мг, 40 Е/мг, 50 Е/мг, 60 Е/мг, 70 Е/мг, 80 Е/мг, 90 Е/мг или 100 Е/мг, которая определяется при помощи *in vitro* анализа активности выделения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида.

**[0021]** Среди прочего, в настоящем изобретении также предложен фармацевтический состав, содержащий рекомбинантный белок I2S, описанный в приведенных в данной заявке различных вариантах реализации изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель, а также способ лечения синдрома Хантера путем введения нуждающемуся в этом субъекту

описанного в данном тексте рекомбинантного белка I2S или содержащего его фармацевтического состава.

**[0022]** Употребляемые в данном тексте термины “белок I2S”, “I2S”, “фермент I2S” или их грамматические эквиваленты относятся к получению молекул рекомбинантного белка I2S, если не указано иное.

**[0023]** Употребляемые в данном тексте термины “около” и “приблизительно” используются как эквивалентные. Подразумевается, что любые численные значения, приведенные в данном тексте с или без “около/приблизительно”, включают любые нормальные отклонения, очевидные для специалиста в соответствующей области техники.

**[0024]** 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

**[0025]** Описанные ниже Фигуры, которые представляют собой Графические материалы, приведены исключительно в иллюстративных, но не ограничительных целях.

**[0026]** На *Фигуре 1* проиллюстрирована аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:1), кодирующая зрелую форму человеческого белка идуронат-2-сульфатазы (I2S), а в пределах белковой последовательности указаны потенциальные участки N-связанного гликозилирования и конверсии цистеина.

**[0027]** На *Фигуре 2* проиллюстрированы типовые конструкции для коэкспрессии I2S и FGE (т.е. SUMF1). (A) Экспрессионные единицы на отдельных векторах (для котрансфекции или последовательных трансфекций); (B) Экспрессионные единицы на одном векторе (одна трансфекция): (1) отдельные цистроны и (2) транскрипционно связанные цистроны.

**[0028]** На *Фигуре 3* проиллюстрированы типовые наблюдаемые уровни специфической активности I2S, скоррелированные относительно процента конверсии в формилглицин.

**[0029]** На *Фигуре 4* проиллюстрирован типовой профиль гликанов, соответствующий рекомбинантному ферменту I2S, полученному при использовании клеточных линий I2S-AF

2D и 4D, выращиваемых в условиях бессывороточного клеточного культивирования, в сравнении с контрольным рекомбинантным ферментом I2S.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**[0030]** Для лучшего понимания настоящего изобретения приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для нижеприведенных терминов и других терминов приведены в продолжение всего описания изобретения.

**[0031]** *Аминокислота.* Употребляемый в данном тексте термин “аминокислота” в самом широком своем смысле обозначает любое соединение и/или вещество, которое может быть включено в полипептидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота имеет следующую общую структуру:  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота является аминокислотой природного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота является синтетической аминокислотой; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота является D-аминокислотой; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота является L-аминокислотой. “Стандартная аминокислота” относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, которые обычно входят в состав пептидов природного происхождения. “Нестандартная аминокислота” относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, вне зависимости от того, получена ли она синтетически или из природного источника. Употребляемый в данном тексте термин “синтетическая аминокислота” включает в себя химически модифицированные аминокислоты, включая, но не ограничиваясь этим, соли, производные аминокислот (такие как амиды) и/или замещения. Аминокислоты, включая карбокси- и/или amino-терминальные аминокислоты в пептидах, можно модифицировать посредством метилирования, амидирования, ацетилирования, защитных групп и/или замещений другими химическими группами, которые могут изменить время полужизни циркуляции пептидов без существенного влияния на их активность. Аминокислоты могут участвовать в образовании дисульфидной связи. Аминокислоты могут содержать одну или более посттрансляционных модификаций, таких как ассоциация с одним или более химических компонентов (*например*, метильными группами, ацетатными группами, ацетильными группами, фосфатными группами, формильными компонентами, изопреноидными группами, сульфатными группами, полиэтиленгликольными компонентами, липидными компонентами, углеводными компонентами, биотиновыми компонентами и *т.д.*). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислоты согласно настоящему изобретению можно включать или использовать в качестве добавки в среде для клеточных

культур. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислоты, включенные или применяемые в качестве добавки в клеточной культуральной среде, могут быть представлены в виде солей или в гидратной форме.

**[0032]** *Приблизительно.* Употребляемый в данном тексте термин “приблизительно” или “около”, применяемый в отношении одной или более представляющих интерес величин, обозначает величину, которая является сходной с указанной заданной величиной. В определенных вариантах реализации изобретения термин “приблизительно” или “около” 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).

**[0033]** *Периодическая культура.* Употребляемый в данном тексте термин “периодическая культура” относится к способу культивирования клеток, в котором все компоненты, которые, в конечном счете, будут применены в культивировании клеток, включая среду (смотрите определение “среды” ниже), а также сами клетки добавляют в начале процесса культивирования. Периодическую культуру обычно останавливают в определенной точке, а клетки и/или компоненты из среды собирают и в некоторых случаях очищают.

**[0034]** *Биодоступность.* Употребляемый в данном тексте термин “биодоступность” в общем случае относится к той процентной доле введенной дозы, которая достигает кровотока субъекта.

**[0035]** *Биологически активный.* Употребляемая в данном тексте 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 этот 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 высвобождения 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 дополнительного процессинга для того, чтобы стать биологически активным. В некоторых вариантах реализации изобретения белок для того, чтобы стать биологически активным, требует 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 дополнительной модификации для того, чтобы стать биологически активным.

**[0036]** *Биореактор.* Употребляемый в данном тексте термин “биореактор” относится к емкости, используемой для выращивания хозяйской клеточной культуры. Биореактор может иметь любой размер, подходящий для культивирования клеток млекопитающих. Как правило, объем биореактора составляет по меньшей мере 1 литр и может составлять 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 120000 литров или более, либо любое из промежуточных значений. Условия внутри биореактора, включая, но не ограничиваясь этим, уровень pH, осмолярность, насыщение CO<sub>2</sub>, насыщение O<sub>2</sub>, температуру и комбинации указанных параметров, обычно регулируют во время периода культивирования. Биореактор может быть выполнен из любого материала, который подходит для содержания клеток в среде в условиях культивирования согласно настоящему изобретению, включая стекло, пластик или металл. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор можно применять для выращивания культуры клеток животных. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор можно применять для выращивания культуры клеток млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор можно применять для клеток и/или клеточных линий, полученных из таких организмов, как, без ограничений, клетки млекопитающих, клетки насекомых, бактериальные клетки, дрожжевые клетки и человеческие клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор применяют для получения клеточных культур в больших масштабах, а его объем составляет по меньшей мере 100 литров и может составлять 200, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 120000 литров или более, либо любое из промежуточных значений. Специалист в данной области техники обладает соответствующими знаниями и сможет выбрать подходящие биореакторы для практической реализации настоящего изобретения.

**[0037]** *Клеточная культура.* Этот термин при употреблении в данном тексте относится к клеточной популяции, которая выращивается в среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста клеточной популяции. Для специалиста в данной области техники

понятно, что указанные термины при употреблении в данном тексте могут относиться к комбинации, включающей клеточную популяцию и среду, в которой эта популяция выращивается.

**[0038]** *Культивирование*. Употребляемый в данном тексте термин “культивирование” или его грамматические эквиваленты относятся к процессу содержания клеток в условиях, способствующих росту и выживанию. Термины “культивирование” и “клеточная культура” либо любые другие синонимы используются в данном тексте взаимозаменяемо.

**[0039]** *Емкость для культивирования*. Употребляемый в данном тексте термин “емкость для культивирования” относится к любому контейнеру, который может обеспечить асептическую среду для культивирования клеток. Типовые емкости для культивирования включают, но не ограничиваются этим, стеклянные, пластиковые или металлические контейнеры.

**[0040]** *Ферментозаместительная терапия (ФЗТ)*. Употребляемый в данном тексте термин “ферментозаместительная терапия (ФЗТ)” относится к любой терапевтической стратегии, которая ликвидирует дефицит ферментов путем введения необходимых ферментов. В некоторых вариантах реализации изобретения необходимый фермент вводят путем интратекального введения. В некоторых вариантах реализации изобретения необходимый фермент вводят путем инфузии в кровоток. 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.

**[0041]** *Экспрессия*. При употреблении в данном тексте “экспрессией” нуклеотидной последовательности называют один или более из следующих процессов: (1) получение РНК-матрицы по последовательности ДНК (*например*, путем транскрипции); (2) процессинг РНК-транскрипта (*например*, путем сплайсинга, редактирования, образования 5' кэпа и/или образования 3' конца); (3) трансляцию РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционную модификацию полипептида или белка.

**[0042]** *Культура с подпиткой*. Употребляемый в данном тексте термин “культура с подпиткой” относится к способу культивирования клеток, в котором в культуру добавляют дополнительные компоненты через какое-то время после начала процесса культивирования. Добавляемые компоненты обычно содержат питательные добавки для клеток, которые истощились во время процесса культивирования. Культуру с подпиткой

обычно останавливают в определенной точке, а клетки и/или компоненты из среды собирают и в некоторых случаях очищают.

**[0043]** *Фрагмент.* Употребляемый в данном тексте термин “фрагмент” относится к полипептидам и определяется как любая дискретная часть данного полипептида, которая является уникальной или характерной для этого полипептида. Также при употреблении в данном тексте указанный термин относится к любой дискретной части данного полипептида, которая сохраняет по меньшей мере часть активности полноразмерного полипептида. Предпочтительно, чтобы часть активности, которая сохраняется, составляла по меньшей мере 10% активности полноразмерного полипептида. Более предпочтительно, чтобы часть активности, которая сохраняется, составляла по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% активности полноразмерного полипептида. Еще более предпочтительно, чтобы часть активности, которая сохраняется, составляла по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% активности полноразмерного полипептида. Наиболее предпочтительно, чтобы часть активности, которая сохраняется, составляла 100% активности полноразмерного полипептида. Также при употреблении в данном тексте указанный термин относится к любой части заданного полипептида, которая содержит по меньшей мере один установленный элемент последовательности, содержащийся в полноразмерном полипептиде. Предпочтительно, чтобы элемент последовательности совпадал с по меньшей мере 4-5, более предпочтительно – по меньшей мере около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислот полноразмерного полипептида.

**[0044]** *Ген.* Употребляемый в данном тексте термин “ген” относится к любой нуклеотидной последовательности, ДНК или РНК, по меньшей мере часть которой кодирует конечный дискретный продукт, как правило, но не ограничиваясь этим, полипептид, который участвует в каком-либо аспекте клеточного процесса. Указанный термин относится не только к кодирующей последовательности, которая кодирует полипептид либо другой конечный дискретный продукт, но также может включать участки, предшествующие и следующие за кодирующей последовательностью, которые модулируют базовый уровень экспрессии, а также встроенные последовательности (“интроны”) между отдельными кодирующими сегментами (“экзонами”). В некоторых вариантах реализации изобретения ген может содержать регуляторные последовательности (*например*, промоторы, энхансеры, последовательности полиаденилирования, последовательности терминации, последовательности Козака, ТАТА-боксы и *т.д.*) и/или модификационные последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения ген может содержать привязки к нуклеиновым кислотам, которые не кодируют белки, но

кодируют функциональные молекулы РНК, такие как тРНК, РНК-индуцирующие вещества и *т.д.*

**[0045]** *Генный продукт* или *продукт экспрессии*. Употребляемый в данном тексте термин “генный продукт” или “продукт экспрессии” в общем случае относится к РНК, транскрибируемой с гена (до и/или после процессинга), или полипептиду (до и/или после модификации), кодируемому РНК, транскрибированной с гена.

**[0046]** *Генетический регуляторный элемент*. Употребляемый в данном тексте термин “генетический регуляторный элемент” относится к любому элементу последовательности, который модулирует экспрессию гена, с которым он функционально связан. Генетические регуляторные элементы могут действовать, как повышая, так и снижая уровни экспрессии, и могут располагаться до, в пределах или за кодирующей последовательностью. Генетические регуляторные элементы могут действовать на любом этапе генной экспрессии, регулируя, например, инициацию, элонгацию или терминацию транскрипции, сплайсинг мРНК, редактирование мРНК, стабильность мРНК, локализацию мРНК в клетке, инициацию, элонгацию или терминацию трансляции, или любой другой этап генной экспрессии. Генетические регуляторные элементы могут действовать по отдельности либо в комбинации друг с другом.

**[0047]** *Гомология*. Употребляемый в данном тексте термин “гомология” относится к полному сходству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновых кислот (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК), и/или между полипептидными молекулами. В некоторых вариантах реализации изобретения полимерные молекулы считаются “гомологичными” по отношению друг к другу, если их последовательности идентичны по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах реализации изобретения полимерные молекулы считаются “гомологичными” по отношению друг к другу, если их последовательности одинаковы по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

**[0048]** *Идентичность*. Употребляемый в данном тексте термин “идентичность” относится к полному сходству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновых кислот (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК), и/или между полипептидными молекулами. Расчет процентной идентичности двух нуклеотидных последовательностей, к примеру, можно проводить путем выравнивания двух последовательностей для оптимального сравнения (*например*, можно вносить гэпы в одну или обе – первую и вторую – нуклеотидные последовательности для оптимального

выравнивания, а неидентичными последовательностями в целях сравнения можно пренебречь). В определенных вариантах реализации изобретения длина последовательности, выравниваемой для сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или практически 100% от длины контрольной последовательности. Затем проводят сравнение нуклеотидов в соответствующих нуклеотидных позициях. Если позицию в первой последовательности занимает такой же нуклеотид, что и соответствующую позицию во второй последовательности, молекулы считаются идентичными в указанной позиции. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций в указанных последовательностях с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, который нужно внести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществить при помощи математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить при помощи алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17), который используется в программе ALIGN (версия 2.0), с применением таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину гэпа 12 и штрафа за гэп 4. В альтернативном варианте процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить при помощи программы GAP из пакета программного обеспечения GCG, используя матрицу NWSgapdna.CMP. Многие другие программы для выравнивания последовательностей, такие как Clustal, являются доступными и могут быть использованы для определения идентичности последовательностей.

**[0049]** *Улучшаться, повышаться или снижаться.* При употреблении в данном тексте 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 данном 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(ых) особи(ей) сравнимы).

**[0050]** *Инtrateкальное введение.* Употребляемый в данном тексте термин “инtrateкальное введение” или “инtrateкальная инъекция” относится к инъекции в спинномозговой канал (инtrateкальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно использовать разные методы, включая, но не ограничиваясь этим, латеральную церебровентрикулярную инъекцию через отверстие бора или цистернальную или поясничную пункцию и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения “инtrateкальное введение” или “инtrateкальная доставка” согласно настоящему изобретению относится к ИТ введению или доставке через поясничную область или участок, т.е. к поясничному ИТ введению или доставке. Употребляемый в данном тексте 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.

**[0051]** *Выделенный.* Употребляемый в данном тексте термин “выделенный” относится к веществу и/или соединению, которое было (1) отделено от по меньшей мере некоторых компонентов, с которыми оно связано при исходном получении (в природе и/или экспериментальной установке), и/или (2) получено, изготовлено и/или произведено человеком. Выделенные вещества и/или соединения могут быть отделены от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% других компонентов, с которыми они изначально были связаны. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенные вещества являются очищенными приблизительно на 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99%. При употреблении в данном тексте вещество является “очищенным”, если оно в значительной степени свободно от других компонентов. При использовании в данном тексте расчет процента очистки выделенных веществ и/или соединений не должен включать вспомогательные вещества (*например*, буфер, растворитель, воду и т.д.).

**[0052]** *Среда.* При употреблении в данном тексте этот термин обозначает раствор, содержащий питательные вещества, которые питают растущие клетки. Как правило, эти растворы содержат незаменимые и заменимые аминокислоты, витамины, источники

энергии, липиды и следовые элементы, необходимые для минимального роста и/или выживания клеток. Раствор может также содержать компоненты, которые повышают рост и/или выживание относительно минимального уровня, включая гормоны и факторы роста. В некоторых вариантах реализации изобретения среду получают с оптимальными для выживания и пролиферации клеток уровнем рН и солевой концентрацией. В некоторых вариантах реализации изобретения среда может являться “химически определенной средой” – бессывороточной средой, которая не содержит белков, гидролизатов или компонентов с неизвестным составом. В некоторых вариантах реализации изобретения химически определенная среда не содержит компонентов животного происхождения, а все компоненты среды имеют известную химическую структуру. В некоторых вариантах реализации изобретения среда может являться “средой на сывороточной основе” – средой, которая была дополнена компонентами животного происхождения, такими как, без ограничений, фетальная телячья сыворотка, лошадиная сыворотка, козляная сыворотка, ослиная сыворотка и/или их комбинации.

**[0053]** *Нуклеиновая кислота.* Употребляемый в данном тексте термин “нуклеиновая кислота” в самом широком своем смысле обозначает любое соединение и/или вещество, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь при помощи фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения “нуклеиновая кислота” относится к отдельным остаткам нуклеиновых кислот (*например*, нуклеотидам и/или нуклеозидам). В некоторых вариантах реализации изобретения “нуклеиновая кислота” относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновых кислот. Употребляемые в данном тексте термины “олигонуклеотид” и “полинуклеотид” можно использовать взаимозаменяемо. В некоторых вариантах реализации изобретения “нуклеиновая кислота” включает РНК, а также одно- и/или двухцепочечные ДНК и/или кДНК. Кроме того, термины “нуклеиновая кислота”, “ДНК”, “РНК” и/или подобные им термины включают аналоги нуклеиновых кислот, *т.е.*, аналоги, содержащие скелет, отличный от фосфодиэфирного. Например, так называемые “пептидные нуклеиновые кислоты”, которые известны в данной области техники и содержат в скелете пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей, считаются такими, которые входят в объем настоящего изобретения. Термин “нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность” включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и/или кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные

последовательности, которые кодируют белки и/или РНК, могут содержать интроны. Нуклеиновые кислоты могут быть получены из природных источников и очищены, получены при помощи рекомбинантных экспрессионных систем и, необязательно, очищены, химически синтезированы и *т.д.* Когда это целесообразно, *например*, в случае химически синтезированных молекул, нуклеиновые кислоты могут содержать нуклеозидные аналоги, такие как аналоги, содержащие химически модифицированные основания или сахара, модификации скелета и *т.д.* Последовательность нуклеиновых кислот представляют в направлении от 5' к 3', если не указано иное. Термин “сегмент нуклеиновой кислоты” употребляется в данном тексте для обозначения нуклеотидной последовательности, которая является частью более длинной нуклеотидной последовательности. Во многих вариантах реализации изобретения сегмент нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой или содержит природные нуклеозиды (*например*, аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин, уридин, дезоксиаденозин, дезокситимидин, дезоксигуанозин и дезоксицитидин); нуклеозидные аналоги (*например*, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, С-5 пропинилцитидин, С-5 пропинилуридин, 2-аминоаденозин, С5-бromoуридин, С5-фторуридин, С5-йодоуридин, С5-пропинилуридин, С5-пропинилцитидин, С5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин и 2-тиоцитидин); химически модифицированные основания; биологически модифицированные основания (*например*, метилированные основания); интеркалированные основания; модифицированные сахара (*например*, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксиррибозу, арабинозу и гексозу); и/или модифицированные фосфатные группы (*например*, тиофосфаты и 5'-N-фосфорамидитные соединения). В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение непосредственно относится к “немодифицированным нуклеиновым кислотам”, под которыми подразумеваются те нуклеиновые кислоты (*например*, полинуклеотидам и остаткам, включая нуклеотиды и/или нуклеозиды), которые не были химически модифицированы с целью облегчения или осуществления доставки.

**[0054]** *Процесс перфузии.* Употребляемый в данном тексте термин “процесс перфузии” относится к способу культивирования клеток, в котором дополнительные компоненты добавляют в культуру непрерывно или полунепрерывно после начала процесса культивирования. Добавляемые компоненты обычно содержат питательные добавки для клеток, которые истощились во время процесса культивирования. Часть клеток и/или компонентов среды обычно собирают в непрерывном или полунепрерывном режиме и в

некоторых случаях очищают. Обычно процесс клеточного культивирования, включающий процесс перфузии, называют “перфузионной культурой”. Как правило, питательные добавки добавляют в свежую среду во время процесса перфузии. В некоторых вариантах реализации изобретения свежая среда может быть идентичной или схожей с основной средой, применяемой в процессе клеточного культивирования. В некоторых вариантах реализации изобретения свежая среда может отличаться от основной среды, но при этом содержать необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах реализации изобретения свежая среда является химически определенной средой.

**[0055]** *Белок.* Употребляемый в данном тексте термин “белок” относится к полипептиду (*т.е.* цепи из по меньшей мере двух аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями). Белки могут содержать отличные от аминокислот компоненты (*например*, они могут быть гликопротеинами, протеогликанами и *т.д.*) и/или могут быть процессированными или модифицированными любым другим способом. Специалистам в данной области техники понятно, что “белок” может являться полной полипептидной цепью, которая вырабатывается клеткой (с наличием или отсутствием сигнальной последовательности), либо может быть ее характеристической частью. В некоторых вариантах реализации изобретения белок иногда может содержать более одной полипептидной цепи, например, цепи, связанные одной или более дисульфидных связей или соединенные другими способами. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты либо и те, и другие, и могут содержать любые из множества известных в данной области техники аминокислотных модификаций или аналогов. Применимые модификации включают, *например*, терминальное ацетилирование, амидирование, метилирование и *т.д.* В некоторых вариантах реализации изобретения белки могут содержать аминокислоты природного происхождения, аминокислоты неприродного происхождения, синтетические аминокислоты и их комбинации. В общем случае термин “пептид” используется для обозначения полипептида, длина которого составляет менее чем около 100 аминокислот, менее чем около 50 аминокислот, менее чем около 20 аминокислот или менее чем около 10 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения белки представляют собой антитела, фрагменты антител, их биологически активные части и/или их характеристические части.

**[0056]** *Рекомбинантный белок и рекомбинантный полипептид.* Эти термины используются в данном тексте для обозначения полипептида, экспрессируемого клеткой-хозяином, которая была генетически сконструирована для экспрессии данного

полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной от животного. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной от насекомого. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной из дрожжей. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной из представителя прокариотов. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной от млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может экспрессироваться в клетке-хозяине, полученной от человека. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантно экспрессируемый полипептид может быть идентичным или схожим с полипептидом, который обычно экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантно экспрессируемый полипептид может быть чужеродным клетке-хозяину, т.е. гетерологичным пептидам, которые обычно экспрессируются в клетке-хозяине. В альтернативном варианте в некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантно экспрессируемый полипептид может быть химерным, что означает, что части полипептида содержат аминокислотные последовательности, которые являются идентичными или схожими с полипептидами, обычно экспрессируемыми в клетке-хозяине, в то время как другие части являются чужеродными клетке-хозяину.

**[0057]** *Заместительный фермент.* Употребляемый в данном тексте 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 способов либо очищены из

природных источников. Заместительный фермент может быть рекомбинантным, синтетическим, генно-активируемым или природным ферментом.

**[0058]** *Вектор.* Употребляемый в данном тексте термин “вектор” относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах реализации изобретения векторы способны к внехромосомной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны в клетке-хозяине, такой как эукариотическая и/или прокариотическая клетка. Векторы, способные управлять экспрессией функционально связанных генов, называются в данном тексте “экспрессионными векторами”.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0059]** В настоящем изобретении, среди прочего, предложены способы и композиции для получения рекомбинантного белка I2S с улучшенными эффективностью и активностью при помощи клеток, коэкспрессирующих белки I2S и FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы одновременно сверхэкспрессировать рекомбинантные белки I2S и FGE. Клетки согласно изобретению адаптируемы ко многим условиям клеточного культивирования. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно настоящему изобретению адаптируемы к суспензионному бессывороточному культивированию в больших масштабах.

**[0060]** Различные аспекты изобретения детально описаны в нижеприведенных подразделах. Использование подразделов не ограничивает изобретение. Каждый подраздел можно применять к любому аспекту изобретения. В настоящей заявке использование “или” обозначает “и/или”, если не указано иное.

#### *Идуронат-2-сульфатаза (I2S)*

**[0061]** При употреблении в данном тексте 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 тексте термины “фермент I2S” и “белок I2S” и их грамматические эквиваленты используются взаимозаменяемо.

**[0062]** 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 Таблице 1. Сигнальный пептид выделен подчеркиванием. Вдобавок, в Таблице 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>	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQL ASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSY WRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDS PYSWSFPPYHPSSEK YEN TKTCRGP DGELHANLLCPVDVLD VPEGTL PDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPF RYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVA YNPWMDIRQRE DVQALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLS ALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVATH VPLIFYVPGRTASLPEAGEKLPYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPSFHVELCREGKNLLK HFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLK DIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGEL YFV DSDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:1)
<b>Полноразмерный предшественник (изоформа а)</b>	<u>MPPPR</u> TGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLL IIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQA VCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKE NGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEK YEN TKTCRGP DGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQAIQLL EKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVA YNPWMDIRQRE DVQALNISVPYGPVDFQ RKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLPYLD PFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQV PPRCVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIA YSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVG

	FNPDEFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLF QLLMP(SEQ ID NO:2)
<b>Предшественник, изоформа b</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLL IIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSNIDQLASHSLFQNAFAQQAV CAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKE NGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEK YEN TKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQAIQLL EKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVA YNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQE DQSSTGFRLKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
<b>Предшественник, изоформа c</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLL IIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSNIDQLASHSLFQNAFAQQAV CAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKE NGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEK YEN TKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQAIQLL EKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPD PEVPDGLPPVA YNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQR KIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGF LMRTNT(SEQ ID No:4)

**[0063]** Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения фермент 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 подходящий заместительный фермент 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 заместительный фермент, подходящий для целей настоящего изобретения, является в значительной степени гомологичным зрелому человеческому белку I2S (SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах реализации изобретения заместительный фермент, подходящий для целей настоящего изобретения, 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 заместительный фермент, подходящий для целей настоящего изобретения, является в значительной степени идентичным зрелому человеческому белку

I2S (SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах реализации изобретения заместительный фермент, подходящий для целей настоящего изобретения, 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 заместительный фермент, подходящий для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть зрелого человеческого белка I2S.

**[0064]** В альтернативном варианте фермент I2S представляет собой полноразмерный белок I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент 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 фермент I2S является в значительной степени гомологичным полноразмерному человеческому белку I2S (SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, 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:2. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, является в значительной степени идентичным SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, 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:2. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть полноразмерного человеческого белка I2S. В контексте данного документа полноразмерный белок I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

**[0065]** В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, представляет собой изоформу а человеческого белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий фермент 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 фермент I2S является в значительной степени гомологичным изоформе а человеческого белка I2S (SEQ ID NO:3). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент 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:3. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S является в значительной степени идентичным SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, 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:3. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть изоформы а человеческого белка I2S. В контексте данного документа изоформа а человеческого белка I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

**[0066]** В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S представляет собой изоформу в человеческого белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий фермент I2S может быть гомологом или аналогом изоформы в человеческого белка I2S. Например, гомолог или аналог изоформы в человеческого белка I2S может представлять собой модифицированную изоформу в человеческого белка I2S, содержащую одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с изоформой в 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 фермент I2S является в значительной степени гомологичным изоформе в человеческого белка I2S (SEQ ID NO:4). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент 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:4. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S является в значительной степени идентичным SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент 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:4. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть изоформы b человеческого белка I2S. В контексте данного документа изоформа b человеческого белка I2S обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

**[0067]** Гомологи или аналоги человеческих белков I2S можно получить в соответствии с 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.

**[0068]** В некоторых вариантах реализации изобретения ферменты I2S содержат компонент, который связывается с рецептором на поверхности клеток 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 (M6P). Вдобавок, CI-MPR также связывает другие белки, включая IGF-II. Пригодным 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). В некоторых вариантах реализации изобретения пригодный рецептор, с которым связываются остатки M6P, может быть катион-зависимым.

### ***Формилглицин-образующий фермент (FGE)***

**[0069]** Как правило, на ферментативную активность I2S оказывает влияние посттрансляционная модификация консервативного цистеина (например, соответствующего аминокислоте 59 зрелого человеческого I2S (SEQ ID NO:1)) в формилглицин, который также называют 2-амино-3-оксопропионовой кислотой или оксоаланином. Посттрансляционная модификация обычно происходит в эндоплазматическом

ретикулуле во время синтеза белка и катализируется формилглицин-образующим ферментом (FGE). Специфическая ферментативная активность I2S обычно положительно коррелирует со степенью формилглициновой модификации I2S. Например, препарат белка I2S, который содержит относительно большое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно высокой специфической ферментативной активностью; а препарат белка I2S, который содержит относительно небольшое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно низкой специфической ферментативной активностью.

**[0070]** Таким образом, клетки, подходящие для получения рекомбинантного белка I2S согласно настоящему изобретению, обычно экспрессируют также белок FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодные клетки экспрессируют эндогенный белок FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодные клетки сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать экзогенный (также называемый рекомбинантным) формилглицин-образующий фермент (FGE) в комбинации с рекомбинантным I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодные клетки сконструированы таким образом, чтобы активировать эндогенный ген FGE так, чтобы повысить уровень экспрессии или активность белка FGE.

**[0071]** Как правило, человеческий белок FGE вырабатывается в форме предшественника. Форма предшественника человеческого FGE содержит сигнальный пептид (аминокислотные остатки 1-33 полноразмерного предшественника) и цепь (остатки 34-374 полноразмерного предшественника). Обычно форму предшественника называют также полноразмерным предшественником или полноразмерным белком FGE, который содержит 374 аминокислоты. Аминокислотные последовательности зрелой формы (SEQ ID NO:5) с удаленным сигнальным пептидом и полноразмерный предшественник (SEQ ID NO:6) типового белка FGE дикого типа или природного происхождения приведены в Таблице 2.

**Таблица 2. Человеческий формилглицин-образующий фермент (FGE)**

<b>Зрелая форма</b>	SQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRY SRE ANAPGPVPGERQLAHSKMVPIAGVFTMGTD DDPQIKQDGEA PARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEFEKFNSTGYL TEAEKFGDSF VFEGMLSEQVKTNIQQA VAAAPWWLPVKGANWRHPEGPD STILHRPDHPVLHVSWNDAVA YCTWAGKRLPTEAEWEYSC RGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGF QGTAPVDAFPNGYGLYNIVGNAWEWTS DWWTVHHSVEE
---------------------	--

	TLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD (SEQ ID NO:5)
<b>Полноразмерный предшественник</b>	MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGA GAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSRANAPGPVPG ERQLAHSKMVPPIAGVFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDA FYMDAYEVSNTFEFEKFNSTGYLTAEKFGDSFVFEGMLSE QVKTNIQQA VAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDH PVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGLHNRL FPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDA FPPNGYGLYNIVGNAWEWTSDWWTVHHSVEETLNPKGPPS GKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGF RCAADRLPTMD (SEQ ID NO:6)

**[0072]** Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, представляет собой зрелый человеческий белок FGE (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах реализации изобретения пригодный фермент FGE может быть гомологом или аналогом зрелого человеческого белка FGE. Например, гомолог или аналог зрелого человеческого белка FGE может представлять собой модифицированный зрелый человеческий белок FGE, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с белком FGE дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO:5), и при этом сохранять значительную часть активности белка FGE. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, является в значительной степени гомологичным зрелому человеческому белку FGE (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, 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:5. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, является в значительной степени идентичным зрелому человеческому белку FGE (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, 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:5. В некоторых вариантах реализации

изобретения фермент FGE, подходящий для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть зрелого человеческого белка FGE.

**[0073]** В альтернативном варианте фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, представляет собой полноразмерный человеческий белок FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE может быть гомологом или аналогом полноразмерного человеческого белка FGE. Например, гомолог или аналог полноразмерного человеческого белка FGE может представлять собой модифицированный полноразмерный человеческий белок FGE, содержащий одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций по сравнению с полноразмерным белком FGE дикого типа или природного происхождения (например, SEQ ID NO:6), и при этом сохранять значительную часть активности белка FGE. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, является в значительной степени гомологичным полноразмерному человеческому белку FGE (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, 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:4. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, является в значительной степени идентичным SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, подходящий для целей настоящего изобретения, 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:6. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть полноразмерного человеческого белка FGE. В контексте данного документа полноразмерный белок FGE обычно содержит сигнальную пептидную последовательность.

**[0074]** Типовые нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности, кодирующие типовые белки FGE, раскрыты в публикации США № 20040229250, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

*Клетки, коэкспрессирующие I2S и FGE*

**[0075]** В настоящем изобретении указывается на необходимость коммерческого производства биологически активного I2S на высоком уровне при помощи системы клеточного культивирования. Так как большое количество производственных факторов могут влиять на выбор определенной клетки-хозяина, молекулы нуклеиновых кислот, раскрытые в настоящем изобретении, относятся к широкому спектру прокариотических и эукариотических клеток и/или клеточных линий, включая, без ограничений, клеточные линии, полученные из штаммов бактерий, штаммов дрожжей, клеток насекомых, клеток животных, клеток млекопитающих и клеток человека. В аспектах настоящего изобретения также предложены экспрессионные конструкции и генерация рекомбинантных стабильных клеточных линий, подходящих для экспрессии белков I2S и/или FGE, как природного происхождения, так и модифицированных, которые раскрыты в настоящем изобретении. Вдобавок, в аспектах настоящего изобретения также предложены способы для получения клеточных линий, которые экспрессируют I2S и FGE, при помощи раскрытых в настоящем изобретении нуклеотидных последовательностей.

*Нуклеиновые кислоты, кодирующие белки I2S и/или FGE*

**[0076]** В некоторых вариантах реализации изобретения предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие представляющий интерес рекомбинантный ген (называемый в данном тексте трансгеном), такой как белок I2S и/или FGE, описанный во многих приведенных в данном тексте вариантах реализации изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая трансген, может быть модифицирована для того, чтобы обеспечить повышенную экспрессию кодируемого белка I2S и/или FGE, что также называется кодонной оптимизацией. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая трансген, может быть модифицирована путем изменения открытой рамки считывания для кодирующей последовательности. Употребляемый в данном тексте термин “открытая рамка считывания” является синонимом “ОРС” и обозначает любую нуклеотидную последовательность, которая потенциально способна кодировать белок или часть белка. Открытая рамка считывания обычно начинается со стартового кодона (представленного в стандартном коде в виде, например, AUG для молекулы РНК и ATG в молекуле ДНК), состоит из кодонов-триплетов и заканчивается стоп-кодоном (представленным в стандартном коде в виде, например, UAA, UGA или UAG для молекулы РНК и TAA, TGA или TAG в молекуле ДНК). Употребляемый в данном тексте термин “кодон” обозначает последовательность из трех нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты, которая

определяет конкретную аминокислоту во время синтеза белка; также его называют триплетом или кодон-триплетом. Например, из 64 возможных кодонов в стандартном генетическом коде два кодона – GAA и GAG – кодируют аминокислоту глутамин, а кодоны AAA и AAG соответствуют аминокислоте лизину. В стандартном генетическом коде три кодона являются стоп-кодонами, которые не соответствуют ни одной аминокислоте. Употребляемый в данном тексте термин “синонимический кодон” обозначает любой и любые кодоны, которые кодируют одну аминокислоту. За исключением метионина и триптофана, аминокислоты кодируют от двух до шести синонимических кодонов. Например, в стандартном генетическом коде четырьмя синонимическими кодонами, которые кодируют аминокислоту аланин, являются GCA, GCC, GCG и GCU, двумя синонимическими кодонами, которые определяют глутамин, являются GAA и GAG, а двумя синонимическими кодонами, которые кодируют лизин, являются AAA и AAG.

**[0077]** В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновую кислоту, кодирующую открытую рамку считывания белка I2S и/или FGE, можно модифицировать при помощи стандартных способов кодонной оптимизации. Для практической реализации настоящего изобретения доступны и могут применяться различные коммерческие алгоритмы кодонной оптимизации. Как правило, кодонная оптимизация не приводит к изменению кодируемых аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом кодонной оптимизации могут быть такие аминокислотные изменения, как замены, делеции или инсерции. Как правило, такие аминокислотные изменения не оказывают существенного влияния на активность белка.

**[0078]** Типовые нуклеотидные последовательности, кодирующие белки I2S и FGE, соответственно, показаны ниже как SEQ ID NO:7 и 8.

*SEQ ID NO:7 Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая идуонат-2-сульфатазу (I2S)*

ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCAGC  
 GTGTGCGTGGCCCTGGGCAGCGAGACCCAGGCCAACAGCACCACCGACGCCCTGAA  
 CGTGCTGCTGATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGCGACAA  
 GCTGGTGCAGCCCCAACATCGACCAGCTGGCCAGCCACAGCCTGCTGTTCCAGA  
 ACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTGTGCGCCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTGACCGGCC  
 GCCGCCCCGACACCACCCGCCTGTACGACTTCAACAGCTACTGGCGCGTGCACGCCG  
 GCAACTTCAGCACCATCCCCAGTACTTCAAGGAGAACGGCTACGTGACCATGAGC  
 GTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCGACGACAGCCCCTA  
 CAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCACCCAGCAGCGAGAAGTACGAGAACACCAAGA  
 CCTGCCGCGGCCCGACGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGCCCGTGGACGTG  
 CTGGACGTGCCCGAGGGCACCCCTGCCCGACAAGCAGAGCACCGAGCAGGCCATCCA  
 GCTGCTGGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCTTCTTCTGGCCGTGGGCTACC  
 ACAAGCCCCACATCCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCAGAAAGCTGTACCCCCTGG  
 AGAACATCACCCCTGGCCCCCGACCCCGAGGTGCCCGACGGCCTGCCCCCGTGGCCT  
 ACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAGCGCGAGGACGTGCAGGCCCTGAACATCAGC  
 GTGCCCTACGGCCCCATCCCCGTGGACTTCCAGCGCAAGATCCGCCAGAGCTACTTC  
 GCCAGCGTGAGCTACCTGGACACCCAGGTGGGCCGCCTGCTGAGCGCCCTGGACGA  
 CCTGCAGCTGGCCAACAGCACCATCATCGCCTTACCAGCGACCACGGCTGGGCCCT  
 GGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAACTTCGACGTGGCCACCCACGTGC  
 CCCTGATCTTCTACGTGCCCGGCCGACCGCCAGCCTGCCCGAGGCCGGCGAGAAG  
 CTGTTCCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCCAGCCAGCTGATGGAGCCCGGCCGC  
 CAGAGCATGGACCTGGTGGAGCTGGTGAGCCTGTTCCCCACCCTGGCCGGCCTGGCC  
 GGCCTGCAGGTGCCCCCCCGCTGCCCGTGCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGC  
 GAGGGCAAGAACCTGCTGAAGCACTTCCGCTTCCGCGACCTGGAGGAGGCCCTA  
 CCTGCCCGGCAACCCCGCGAGCTGATCGCCTACAGCCAGTACCCCGCCCCAGCG  
 ACATCCCCCAGTGGAACAGCGACAAGCCCAGCCTGAAGGACATCAAGATCATGGGC  
 TACAGCATCCGCACCATCGACTACCGCTACACCGTGTGGGTGGGCTTCAACCCCGAC  
 GAGTTCCTGGCCAACCTCAGCGACATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTCGTGGACAGC  
 GACCCCTGCAGGACCACAACATGTACAACGACAGCCAGGGCGGCCGACCTGTTCCA  
 GCTGCTGATGCCCTAG

*SEQ ID NO:8 Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный формилглицин-образующий фермент-предшественник (FGE)*

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTC  
 CTCTTGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGG  
 ACCGGTGCGGGCGCGGGGTCCCTTGCGGGTCTTGCGGCTGCGGCCACGCCCCAGCG  
 GCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAACG  
 CTCCGGGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATC  
 CCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGATGATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGA  
 AGCACCTGCGAGGAGAGTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCTATGAAGTCAG  
 TAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACTCAACTGGCTATTTGACAGAGGCTGAGAA  
 GTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATAT  
 TCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCGCTAACTGGAG  
 ACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCATCCAGTTCTCCA  
 TGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCAC  
 GGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCCT  
 GGGGCAACAACACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTATGCCAACATTTGGCAGGGCGAG  
 TTTCCGGTGACCAACACTGGTGGAGGATGGCTTCCAAGGAACTGCGCCTGTTGATGCC  
 TTCCCTCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACGCATGGGAATGGACT

TCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAAGGTCCC  
 CCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTACATGTGCCATAGGTCTTA  
 TTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTC  
 GAATCTGGGATTCCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACCATGGACTGA

**[0079]** В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная замена может приводить к изменению синонимического кодона в открытой рамке считывания с целью согласования с частотой использования эндогенного кодона, который находится в конкретной гетерологичной клетке, выбранной для экспрессии I2S и/или FGE. В альтернативном или дополнительном варианте нуклеотидная замена может приводить к изменению содержания G+C в открытой рамке считывания для того, чтобы больше соответствовать среднему содержанию G+C открытых рамок считывания, которые находятся в эндогенных нуклеотидных последовательностях гетерологичной клетки-хозяина. Нуклеотидная замена также может приводить к изменению полимононуклеотидной области или внутреннего регуляторного или структурного участка, который присутствует в последовательности I2S или FGE. Таким образом, рассматривается большое количество модифицированных или оптимизированных нуклеотидных последовательностей, включая, без ограничений, нуклеотидные последовательности, обеспечивающие повышенную экспрессию белков I2S и/или FGE в прокариотической клетке; дрожжевой клетке; клетке насекомого; и в клетке млекопитающего.

**[0080]** Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок I2S, подходящий для целей настоящего изобретения, имеет нуклеотидную 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:7. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок FGE, пригодный для целей настоящего изобретения, имеет нуклеотидную 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:8. Как правило, модифицированная нуклеиновая кислота кодирует белок I2S и/или FGE с или без изменений в аминокислотной последовательности. В случае аминокислотных изменений, такие изменения обычно не приводят к значительному изменению активности белка I2S или FGE.

*Экспрессионные векторы*

**[0081]** Нуклеотидную последовательность, кодирующую белок I2S и/или FGE, как описано в настоящей заявке, можно молекулярно клонировать (вносить) в подходящий вектор для размножения или экспрессии в клетке-хозяине. Для практической реализации настоящего изобретения можно применять большое количество экспрессионных векторов, включая, без ограничений, прокариотический экспрессионный вектор; экспрессионный вектор дрожжей; экспрессионный вектор насекомых и экспрессионный вектор млекопитающих. Типовые векторы, пригодные для целей настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются этим, векторы на вирусной основе (например, векторы на основе AAV, векторы на основе ретровирусов, векторы на основе плазмид). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие, соответственно, белки I2S и FGE, могут быть внесены в отдельные векторы. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие, соответственно, белки I2S и FGE, могут быть внесены в один и тот же вектор. Как правило, нуклеиновая кислота, кодирующая белок I2S или FGE, функционально связана с различными регуляторными последовательностями или элементами.

#### Регуляторные последовательности или элементы

**[0082]** Различные регуляторные последовательности или элементы можно включать в экспрессионный вектор, пригодный для целей настоящего изобретения. Типовые регуляторные последовательности или элементы включают, но не ограничиваются этим, промоторы, энхансеры, репрессоры или суппрессоры, 5' нетранслируемые (или некодирующие) последовательности, интроны, 3' нетранслируемые (или некодирующие) последовательности.

**[0083]** При употреблении в данном тексте “промотор” или “промоторная последовательность” представляет собой регуляторную область ДНК, способную связывать РНК полимеразу в клетке (например, прямо или посредством других связанных с промотором белков или веществ) и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Промоторная последовательность в общем случае связана с 3' концом посредством сайта инициации транскрипции, простирается вверх (в направлении 5') и содержит минимальное количество оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на любом уровне. Промотор может быть функционально ассоциирован или функционально связан с последовательностями, управляющими экспрессией, включая энхансерные или репрессорные последовательности, или с нуклеиновой кислотой, которая должна экспрессироваться. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор

может быть индуцибельным. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцибельный промотор может быть однонаправленным или двунаправленным. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор может быть конститутивным промотором. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор может быть гибридным промотором, в котором последовательность, содержащая участок управления транскрипцией, получена из одного источника, а последовательность, содержащая участок инициации транскрипции, получена из второго источника. Системы для присоединения контрольных элементов к кодирующей последовательности в трансгене хорошо известны в данной области техники (общие методы молекулярной биологии и рекомбинантных ДНК описаны в Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, которая включена в данный документ посредством ссылки). Коммерческие векторы, пригодные для внесения трансгена для экспрессии в разных клетках-хозяевах в различных условиях роста и индуцирования, также хорошо известны в данной области техники.

**[0084]** В некоторых вариантах реализации изобретения для регулирования экспрессии трансгена в клетке-хозяине млекопитающего можно применить специфический промотор, такой как, без ограничений, промотор SR $\alpha$  (Takebe et al., *Molec. and Cell. Bio.* 8:466-472 (1988)), немедленно-ранний промотор CMV человека (Boshart et al., *Cell* 41:521-530 (1985); Foecking et al., *Gene* 45:101-105 (1986)), промотор CMV человека, промотор CMV5 человека, немедленно-ранний промотор CMV мышей, промотор EF1- $\alpha$ , гибридный промотор CMV для специфической экспрессии в печени (например, полученный путем конъюгации немедленно-раннего промотора CMV с транскрипционными элементами промотора  $\alpha$ -1-антитрипсина (HAT) человека или промотора альбумина (HAL) человека) или промоторы для специфической экспрессии в гепатоме (например, такие, в которых транскрипционные элементы промотора альбумина человека (HAL; около 1000 п.о.) или  $\alpha$ -1-антитрипсина человека (HAT, около 2000 п.о.) соединены с энхансерным элементом  $\alpha$ -1-микроглобулина человека длиной 145 и геном предшественника бикунина (AMBP); HAL-AMBP и HAT-AMBP); ранняя область промотора SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304-310 (1981)), немедленно-ранний промотор *Orgyia pseudotsugata*, промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)); или регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)). В некоторых вариантах реализации изобретения промотор млекопитающего является конститутивным промотором, таким как, без ограничений, промотор гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPTR), промотор аденозиндеаминазы, промотор

пируваткиназы, промотор бета-актина, а также другие конститутивные промоторы, известные специалистам в данной области техники.

**[0085]** В некоторых вариантах реализации изобретения для регулирования экспрессии трансгена в прокариотической клетке-хозяине можно применить специфический промотор, такой как, без ограничений, промотор  $\beta$ -лактамазы (Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 (1978)); tac-промотор (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); промотор T7, промотор T3, промотор M13 или промотор M16; в дрожжевой клетке-хозяине можно применить, без ограничений, промотор GAL1, GAL4 или промотор GAL10, ADH-промотор (промотор алкогольдегидрогеназы), PGK-промотор (промотор фосфоглицеролкиназы), промотор алкалинфосфатазы, промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы III (TDH3), промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы II (TDH2), промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы I (TDH1), промотор пируваткиназы (PYK), энлазы (ENO) или триозофосфатдегидрогеназы (TPI).

**[0086]** В некоторых вариантах реализации изобретения промотор может быть одним из вирусных промоторов, многие из которых способны регулировать экспрессию трансгена в нескольких типах клеток-хозяев, включая клетки млекопитающих. Вирусные промоторы, которые оказались способными управлять конститутивной экспрессией кодирующих последовательностей в эукариотических клетках, включают, например, промоторы вируса обезьян, промоторы вируса простого герпеса, промоторы вируса папилломы, аденовирусные промоторы, промоторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промоторы вируса саркомы Рауса, промоторы цитомегаловируса (CMV) и длинные концевые повторы (ДКП) вируса мышинного лейкоза Молони и других ретровирусов, промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса, а также другие вирусные промоторы, известные специалистам в данной области техники.

**[0087]** В некоторых вариантах реализации изобретения генные регуляторные элементы экспрессионного вектора могут также включать 5' нетранскрибируемые и 5' нетранслируемые последовательности, принимающие участие в инициации, соответственно, транскрипции и трансляции, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ, последовательность Козака и т.п. В некоторых случаях могут применять энхансерные элементы для повышения уровней экспрессии полипептида или белка. Примеры энхансерных элементов, которые продемонстрировали свою функциональность в клетках млекопитающих, включают энхансер раннего гена SV40, описанный в Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4: 761, и энхансер/промотор, полученный из длинного концевого повтора (ДКП) вируса саркомы

Рауса (BCP), описанный в Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777, а также цитомегаловирус человека, описанный в Boshart et al., Cell (1985) 41:521. Генные регуляторные элементы экспрессионного вектора могут также включать 3' нетранскрибируемые и 3' нетранслируемые последовательности, принимающие участие в терминации, соответственно, транскрипции и трансляции, такие как сигнал полиаденилирования (поли А) для стабилизации и процессинга 3' конца мРНК, транскрибируемой с промотора. Поли А сигналы включают, например, поли А сигнал бета-глобина кролика, поли А сигнал бычьего гормона роста, терминаторный/поли А сигнал бета-глобина цыпленка или позднюю поли А область SV40.

### Селектируемые маркеры

**[0088]** Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно, содержат по меньшей мере один селектируемый маркер. В некоторых вариантах реализации изобретения селектируемый маркер представляет собой кодирующую ген устойчивости нуклеотидную последовательность, функционально связанную с одним или более генетических регуляторных элементов, что обеспечивает возможность клетке-хозяину сохранять жизнеспособность в условиях роста в присутствии цитотоксичных химических веществ и/или лекарственных препаратов. В некоторых вариантах реализации изобретения селектируемый агент можно применить для удержания экспрессионного вектора внутри клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения селектируемый агент можно применить для предотвращения модификации (т.е. метилирования) и/или выключения трансгенной последовательности в экспрессионном векторе. В некоторых вариантах реализации изобретения селектируемый агент применяют для поддержания эпизомной экспрессии вектора в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации изобретения селектируемый агент применяют для того, чтобы обеспечить стабильную интеграцию трансгенной последовательности в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения агент и/или ген устойчивости может включать, без ограничений, метотрексат (MTX), дигидрофолатредуктазу (DHFR, патенты США № 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017), ампициллин, неомицин (G418), зеомицин, микофеноловую кислоту или глутаминсинтетазу (GS, патенты США № 5122464; 5770,359; 5827739) для эукариотической клетки-хозяина; тетрациклин, ампициллин,

канамицин или хлорамфеникол для прокариотической клетки-хозяина; и URA3, LEU2, HIS3, LYS2, HIS4, ADE8, CUP1 или TRP1 для дрожжевой клетки-хозяина.

**[0089]** Экспрессионные векторы могут быть трансфицированы, трансформированы и трансдуцированы в клетку-хозяина. Употребляемые в данном тексте термины “трансфекция”, “трансформация” и “трансдукция” относятся к внесению экзогенной нуклеотидной последовательности в клетку-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессионные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие I2S и/или FGE трансфицируют, трансформируют и трансдуцируют в клетку-хозяина одновременно. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессионные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие I2S и/или FGE трансфицируют, трансформируют и трансдуцируют в клетку-хозяина последовательно. Например, сначала можно трансфицировать, трансформировать или трансдуцировать в клетку-хозяина вектор, кодирующий белок I2S, а затем трансфицировать, трансформировать или трансдуцировать вектор, кодирующий белок FGE, и наоборот. Примеры способов трансформации, трансфекции и трансдукции, которые хорошо известны в данной области техники, включают липосомную доставку, т.е. метод Хоули-Нельсона с применением липофектамина™ (Gibco BRL), Focus 15:73 (1193), электропорацию, способ доставки с применением CaPO<sub>4</sub> Грэхэма и Ван дер Эба, *Virology*, 52:456-457 (1978), ДЭАЭ-декстран-опосредованную доставку, микроинъекцию, биолистическую доставку частиц, полибрен-опосредованную доставку, катион-опосредованную липидную доставку, трансдукцию и инфицирование вирусами, такими как, например, ретровирус, лентивирус, аденовирус, адено-ассоциированный вирус и бакуловирус (в случае клеток насекомых). Основные аспекты трансформаций клеток-хозяев были описаны в данной области техники, например, у Axel в патенте США № 4399216; Sambrook, supra, главы 1-4 и 16-18; Ausubel, supra, главы 1, 9, 13, 15, и 16. Информацию о разных методах трансформации клеток млекопитающих смотрите в Keown et al., *Methods in Enzymology* (1989), Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), и Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

**[0090]** После внесения в клетки экспрессионные векторы могут стабильно интегрироваться в геном или существовать в виде внехромосомных конструкций. Также векторы могут быть амплифицированы, а их множественные копии могут существовать в клетке или интегрироваться в геном. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно изобретению могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более копий нуклеиновых кислот, кодирующих белок I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно изобретению могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20

или более копий нуклеиновых кислот, кодирующих белок FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки согласно изобретению могут содержать множественные копии (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более) нуклеиновых кислот, кодирующих оба белка – I2S и FGE.

#### *Клетки-хозяева*

**[0091]** Употребляемый в данном тексте термин “клетки-хозяева” относится к клеткам, которые можно применять для получения рекомбинантного фермента I2S. В частности, клетки-хозяева пригодны для получения рекомбинантного фермента I2S в больших масштабах. Пригодные клетки-хозяева могут быть получены из различных организмов, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающих, растения, птиц (например, птичьих системы), насекомых, дрожжи и бактерии. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки-хозяева являются клетками млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодная клетка-хозяин не является эндосомальной кислотно-дефицитной клеткой.

#### Клеточные линии млекопитающих

**[0092]** В соответствии с настоящим изобретением в качестве клетки-хозяина можно применить любую клетку или тип клеток млекопитающих, которые можно культивировать и которые могут экспрессировать полипептиды. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают эмбриональные клетки почек человека 293 (HEK293), клетки HeLa; линию миеломы мышей штамма BALB/c (NSO/I, 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)); 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 (Нер G2, НВ 8065); опухоль молочной железы мыши (ММТ 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 (Нер G2). В некоторых вариантах реализации изобретения пригодная клетка млекопитающего не является эндосомальной кислотно-дефицитной клеткой.

**[0093]** Вдобавок, в соответствии с настоящим изобретением можно применить любое количество коммерчески и некоммерчески доступных гибридных клеточных линий, которые экспрессируют полипептиды или белки. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что гибридные клеточные линии могут требовать разных условий питания и/или могут требовать разных условий культивирования для оптимального роста и экспрессии полипептида или белка, и соответственно, он сможет при необходимости модифицировать эти условия.

#### Клеточные линии, не принадлежащие млекопитающим

**[0094]** В соответствии с настоящим изобретением в качестве клетки-хозяина можно применить любую клетку или тип клеток, не принадлежащие млекопитающим, которые можно культивировать и которые могут экспрессировать полипептиды. Неограничивающие примеры клеток-хозяев и клеточных линий, не принадлежащих млекопитающим, которые можно применить в соответствии с настоящим изобретением, включают клетки и клеточные линии, полученные из *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica* для дрожжей; *Sodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* и *Manduca sexta* для насекомых; и *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile* для бактерий; и *Xenopus Laevis* из амфибий.

#### Адаптация к адгезивному или суспензионному выращиванию

**[0095]** В определенных вариантах реализации изобретения клетку-хозяина для генерации клеточной линии выбирают на основании определенных предпочтительных характеристик или роста в конкретных условиях, выбранных для культивирования клеток. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что такие характеристики можно определить на основании известных характеристик и/или признаков устойчивой линии (т.е. коммерчески доступной клеточной линии с известными характеристиками) или

путем эмпирической оценки. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточную линию можно выбирать по ее способности к росту на питающем слое клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточную линию можно выбирать по ее способности к росту в суспензии. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточную линию можно выбирать по ее способности к росту в виде адгезивного монослоя клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения такие клетки можно применить с любой емкостью для тканевой культуры или любой емкостью, покрытой пригодным адгезионным субстратом. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий адгезионный субстрат выбран из группы, состоящей из коллагена (например, коллагена I, II, III или IV), желатина, фибронектина, ламинина, витронектина, фибриногена, BD Матригеля™, матрикса базальной мембраны, дерматансульфат протеогликана, поли-D-лизина и/или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения адгезивную клетку-хозяина можно выбирать и модифицировать в определенных условиях роста для выращивания в суспензии. Такие способы модификации адгезивной клетки для выращивания в суспензии известны в данной области техники. Например, клетку можно кондиционировать для выращивания в суспензионной культуре путем постепенного удаления животной сыворотки из питательной среды в течение определенного времени.

### ***Выбор и оценка клеточной линии***

[0096] В соответствии с настоящим изобретением клетки, сконструированные для экспрессии рекомбинантного белка I2S, выбирают по их способности вырабатывать рекомбинантный белок I2S в коммерчески приемлемом масштабе. В частности, сконструированные клетки согласно настоящему изобретению способны вырабатывать рекомбинантный белок I2S на высоком уровне и/или с высокой ферментативной активностью. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящие клетки при культивировании в условиях клеточного культивирования (например, в стандартных суспензионных или адгезивных условиях культивирования в больших масштабах) могут вырабатывать фермент I2S в количестве, равном или большем чем около 5 пикограммов/клетку/день (например, большем, чем около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 пикограммов/клетку/день). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящие клетки при культивировании в условиях клеточного культивирования (например, в стандартных суспензионных или адгезивных условиях культивирования в больших масштабах) способны вырабатывать фермент I2S в количестве, находящемся в диапазоне, составляющем около 5-100 пикограммов/клетку/день (например,

около 5-90 пикограммов/клетку/день, около 5-80 пикограммов/клетку/день, около 5-70 пикограммов/клетку/день, около 5-60 пикограммов/клетку/день, около 5-50 пикограммов/клетку/день, около 5-40 пикограммов/клетку/день, около 5-30 пикограммов/клетку/день, около 10-90 пикограммов/клетку/день, около 10-80 пикограммов/клетку/день, около 10-70 пикограммов/клетку/день, около 10-60 пикограммов/клетку/день, около 10-50 пикограммов/клетку/день, около 10-40 пикограммов/клетку/день, около 10-30 пикограммов/клетку/день, около 20-90 пикограммов/клетку/день, около 20-80 пикограммов/клетку/день, около 20-70 пикограммов/клетку/день, около 20-60 пикограммов/клетку/день, около 20-50 пикограммов/клетку/день, около 20-40 пикограммов/клетку/день, около 20-30 пикограммов/клетку/день).

**[0097]** Как обсуждалось выше, обычно на ферментативную активность I2S оказывает влияние посттрансляционная модификация консервативного цистеина (например, аминокислоты 59) в формилглицин. В общем случае эта посттрансляционная модификация происходит в эндоплазматическом ретикулуме во время синтеза белка и катализируется FGE. Ферментативная активность I2S обычно положительно коррелирует со степенью формилглициновой модификации I2S. Например, препарат I2S, который содержит относительно большое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно высокой специфической ферментативной активностью; а препарат I2S, который содержит относительно небольшое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно низкой специфической ферментативной активностью.

**[0098]** Дополнительно предполагается, что соотношение между белком I2S и FGE или мРНК также может влиять на формилглициновую модификацию полученного рекомбинантного белка I2S. В некоторых вариантах реализации изобретения I2S и FGE, экспрессируемые в подходящей клетке, характеризуются разными уровнями экспрессии белка и/или мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии белка или мРНК I2S по меньшей мере в 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9 или 10 раз выше, чем уровень белка или мРНК для FGE. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии рекомбинантного белка или мРНК FGE по меньшей мере в 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8,

0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9 или 10 раз выше, чем уровень белка или мРНК для I2S.

**[0099]** В некоторых вариантах реализации изобретения подходящие клетки при культивировании в условиях клеточного культивирования (например, в стандартных суспензионных или адгезивных условиях культивирования в больших масштабах) могут вырабатывать белок I2S, содержащий по меньшей мере около 50% (например, по меньшей мере около 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в  $\alpha$ -формилглицин (FGly). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящие клетки при культивировании в условиях клеточного культивирования (например, в стандартных суспензионных или адгезивных условиях культивирования в больших масштабах) могут вырабатывать фермент I2S, содержащий по меньшей мере около 50% (например, по меньшей мере около 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в  $\alpha$ -формилглицин (FGly), и в количестве, равном или большем чем около 5 пикограммов/клетку/день (например, большем чем около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 пикограммов/клетку/день).

#### Процент конверсии в FGly

**[00100]** Для определения процента конверсии в FGly известны и могут быть применены различные способы. В общем случае процент конверсии в формилглицин (%ФГ) можно рассчитать, используя 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 можно применить различные способы. Например, можно применить пептидное картирование. Вкратце, белок I2S можно расщепить на короткие пептиды при помощи протеаз (например, трипсина или химотрипсина). Короткие пептиды можно разделить и получить их характеристики при помощи хроматографии (например, HPLC) так, чтобы можно было определить природу и количество каждого пептида (в частности, пептида, в состав которого входит позиция, соответствующая позиции 59 зрелого человеческого I2S)

в сравнении с контролем (например, белком I2S без конверсии в FGly или белком I2S со 100% конверсией в FGly). 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.

### Специфическая активность

**[00101]** Как обсуждалось выше, обычно на ферментативную активность I2S оказывает влияние посттрансляционная модификация консервативного цистеина (например, аминокислоты 59) в формилглицин. Таким образом, ферментативная активность I2S обычно положительно коррелирует со степенью формилглициновой модификации I2S. Например, препарат I2S, который содержит относительно большое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно высокой специфической ферментативной активностью; а препарат I2S, который содержит относительно небольшое количество формилглициновых модификаций, обычно характеризуется относительно низкой специфической ферментативной активностью.

**[00102]** Для специалиста в данной области техники очевидно, что ферментативную активность рекомбинантного белка I2S, вырабатываемого клетками согласно настоящему изобретению, можно измерить различными *in vitro* и *in vivo* методами. В некоторых вариантах реализации изобретения измеренная при помощи метода определения *in vitro* активности высвобождения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида подходящая ферментативная активность полученного рекомбинантного белка I2S составляет по меньшей мере около 20 Е/мг, 30 Е/мг, 40 Е/мг, 50 Е/мг, 60 Е/мг, 70 Е/мг, 80 Е/мг, 90 Е/мг или 100 Е/мг. В некоторых вариантах реализации изобретения измеренная при помощи метода определения *in vitro* активности высвобождения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида подходящая ферментативная активность полученного рекомбинантного белка I2S находится в диапазоне, составляющем около 20-100 Е/мг (например, около 20-90 Е/мг, около 20-80 Е/мг, около 20-70 Е/мг, около 20-60 Е/мг, около 20-50 Е/мг, около 20-40 Е/мг, около 20-30 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 30-50 Е/мг, около 30-40 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, около 40-50 Е/мг). Типовые условия для проведения определения *in vitro* активности высвобождения сульфата с применением в качестве субстрата гепарин дисахарида приведены ниже. Как правило, в этом методе определяют способность I2S

высвободить сульфат-ионы из субстрата природного происхождения – гепарин дисахарида. Количество высвобожденного сульфата можно определить при помощи ионной хроматографии. В некоторых случаях ионная хроматография включает использование 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 способ 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.

**[00103]** В некоторых вариантах реализации изобретения ферментативную активность рекомбинантного белка I2S, вырабатываемого клетками согласно настоящему изобретению, можно также определить при помощи многих других способов, 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 2 Е/мг, 4 Е/мг, 6 Е/мг, 8 Е/мг, 10 Е/мг, 12 Е/мг, 14 Е/мг, 16 Е/мг, 18 Е/мг 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 с известной активностью средние единицы флуоресценции (СЕФ) можно применить для построения стандартной кривой, которую можно применить для расчета ферментативной активности представляющего интерес образца.

### *Среды и условия для культивирования клеток*

**[00104]** Для получения рекомбинантного белка I2S при помощи сконструированных клеток согласно настоящему изобретению 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 тексте 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 фетуин) и другие компоненты. В некоторых случаях химически определенная среда содержит один или более белков (*например*, белковые факторы роста или цитокины). 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.

**[00105]** В некоторых вариантах реализации изобретения химически определенная питательная среда может быть дополнена одним или более компонентов 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).

**[00106]** Для получения рекомбинантных белков I2S в больших масштабах 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.

**[00107]** 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 экспрессируемого белка I2S***

**[00108]** Для очистки или выделения белка I2S, полученного в соответствии с различными описанными в данном тексте способами, можно применять различные способы реализации изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессируемый белок I2S секретируется в среду, и, следовательно, клетки и другие твердые частицы можно удалить путем, например, центрифугирования или фильтрации на первом этапе процесса очистки. В альтернативном или дополнительном варианте экспрессируемый белок I2S связан с поверхностью клетки-хозяина. В этом варианте реализации изобретения в целях очистки клетки-хозяина, экспрессирующие полипептид или белок, лизируют. Лизис клеток-хозяев млекопитающих можно осуществлять любым из многочисленных способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, включая физическое разрушение при помощи стеклянных гранул и создание условий с высоким уровнем pH.

**[00109]** Белок I2S можно выделять и очищать при помощи стандартных способов, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, эксклюзионную и гидроксиапатитовую хроматографию), гель-фильтрацию, центрифугирование или дифференциальную растворимость, преципитацию этанолом, или

при помощи любого другого доступного способа очистки белков (смотрите, например, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S. J. and Hames, B. D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; and Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997, которые все включены в данный документ посредством ссылки). В частности, в случае иммуноаффинной хроматографии белок можно выделить путем связывания его с аффинной колонкой, содержащей антитела, которые были получены против данного белка и зафиксированы на стационарной подложке. В альтернативном варианте при помощи стандартных рекомбинантных методов к белку можно присоединить аффинные метки, такие как последовательность наружной оболочки инфлюэнцы, поли-гистидин или глутатион-S-трансферазу, для того чтобы облегчить очистку при пропускании через соответствующую аффинную колонку. Для того чтобы снизить или исключить деградацию полипептида или белка во время процесса очистки, на любом его этапе можно добавлять ингибиторы протеаз, такие как фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ), леупептин или апротинин. Ингибиторы протеаз в особенности необходимы в случае лизирования клеток с целью выделения и очистки экспрессируемого полипептида или белка.

**[00110]** Типовые способы очистки описаны в разделе Примеров. Дополнительные способы очистки описаны в предварительной заявке под названием “Очистка рекомбинантного белка I2S”, поданной на регистрацию одновременно с настоящим документом, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### ***Фармацевтический состав и введение***

**[00111]** 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.

**[00112]** В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав вводят субъекту путем внутривенного введения.

**[00113]** В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантный I2S или содержащий его фармацевтический состав вводят субъекту путем интратекального

введения. Употребляемый в данном тексте термин “интратекальное введение” или “интратекальная инъекция” относится к инъекции в спинномозговой канал (интратекальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно применять разные методы, 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 тексте 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.

**[00114]** 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 инжесктировать при помощи шприца. При этом доступны и другие устройства для введения препарата, такие как устройства для инъекции (например, устройства Inject-ease<sup>TM</sup> и Genject<sup>TM</sup>); ручки-инъекторы (такие как GenPen<sup>TM</sup>); безыгольные устройства (например, MediJector<sup>TM</sup> и BioJector<sup>TM</sup>); и подкожные системы доставки на основе пластыря.

**[00115]** 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)).

**[00116]** 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).

**[00117]** 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.

**[00118]** 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, поливинилпироллидон 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.

**[00119]** 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, поливинилпироллидон, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и *т.д.*

**[00120]** 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 стерильную 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.

**[00121]** Употребляемый в данном тексте 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 субъекту 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.

**[00122]** Терапевтически эффективное количество обычно вводят в режиме дозирования, который может включать множественное 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 областях техники медицины.

**[00123]** Дополнительные типовые фармацевтические составы и способы введения описаны в публикации согласно РСТ WO2011/163649 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.

**[00124]** 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 тексте диапазоны дозировок являются только примерами и не ограничивают объема или практической реализации заявляемого изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### **Пример 1. Генерация оптимизированной клеточной линии, коэкспрессирующей рекомбинантные I2S и FGE**

**[00125]** В этом примере проиллюстрирована типовая оптимизированная клеточная линия, коэкспрессирующая рекомбинантные I2S и FGE, которую можно применять для получения рекомбинантного белка I2S. Для специалиста в данной области техники очевидно, что существует большое количество альтернативных подходов, экспрессионных векторов и методов клонирования.

**[00126]** Типичной зрелой формой человеческого фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S) является 525-аминокислотный гликопротеин, который для ферментативной активации подвергается активному процессингу и посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование или конверсия цистеина в формилглицин (Фигура 1). В клетках млекопитающих консервативные остатки цистеина в ферменте I2S (т.е. в аминокислоте 59) преобразуются в формилглицин при помощи формилглицин-образующего фермента (FGE). Конверсия цистеина в формилглицин на активном участке фермента I2S является важным этапом образования активной формы человеческого фермента сульфатазы. Целью данного эксперимента было создание оптимизированной клеточной линии, коэкспрессирующей I2S и FGE, для получения активного рекомбинантного I2S.

**[00127]** На Фигуре 2 приведены типовые конструкции для коэкспрессии I2S и FGE. Например, экспрессионные единицы I2S и FGE могут находиться на отдельных векторах, а отдельные векторы можно трансфицировать совместно или отдельно (Фигура 2A). В альтернативном варианте экспрессионные единицы I2S и FGE могут находиться на одном и том же векторе (Фигура 2B). В одной конфигурации I2S и FGE могут находиться на одном и том же векторе, но регулироваться отдельными промоторами, и называться отдельными цистронами (Фигура 2B(1)). В альтернативном варианте I2S и FGE могут быть сконструированы в виде транскрипционно связанных цистронов, что означает, что I2S и FGE сконструированы в виде открытой рамки считывания под управлением одного промотора (Фигура 2B(2)). Как правило, участок внутренней посадки рибосомы (IRES) сконструирован таким образом, чтобы сделать возможной кэп-независимую инициацию трансляции матричной РНК (Фигура 2B(2)).

**[00128]** Человеческую клеточную линию сконструировали 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:6.

SEQ ID NO: 2

> Полноразмерный предшественник идуронат-2-сульфатазы

MPPPRTRGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLV  
RSPNIDQLASHSLLFQNAFAQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFSTI  
PQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSSEKYENTKTCRGPDGEL  
HANLLCPVDVLDVPEGLTPDKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHMKPHIPFRYPKEF  
QKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQRKIRQ  
SYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVATH  
VPLIFYVPGRTASLPEAGEKLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGL  
QVPPRCVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWN  
SDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMY  
NDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:6

Полноразмерный предшественник человеческого FGE:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRP  
GANGSSAAAHRY SREANAPGPVGERQLAHSKMVPIAGVFTMGTD DDPQIKQDGEAPA  
RRVTIDAFYMDAYEVSNTFEK FVNSTGYL TEAEKFGDSFVFEGMLSEQVK TNIQQA  
AAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVS WNDAVA YCTWAGKRLPTEAEW  
EYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGY  
GLYNIVGNAWEWTS DWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHR SYCYRYR  
CAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

**[00129]** Для генерации экспрессирующей I2S клеточной линии клетки стабильно трансфицировали кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO. 7), кодирующей белок I2S с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:2, и нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO. 8), кодирующей человеческий фермент FGE, приведенный в SEQ ID NO. 6.

SEQ ID NO: 7

> Кодон-оптимизированная идуронат-2-сульфатаза (I2S) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, мРНК

ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCCGCGGCCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCAGC  
GTGTGCGTGGCCCTGGGCAGCGAGACCCAGGCCAACAGCACACCACCGACGCCCTGAA  
CGTGCTGCTGATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGCGACAA  
GCTGGTGCGCAGCCCCAACATCGACCAGCTGGCCAGCCACAGCCTGCTGTTCCAGA  
ACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTGTGCGCCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTGACCGGCC  
GCCGCCCCGACACCACCCGCCTGTACGACTTCAACAGCTACTGGCGCGTGCACGCCG  
GCAACTTCAGCACCATCCCCAGTACTTCAAGGAGAACGGCTACGTGACCATGAGC  
GTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCGACGACAGCCCTA  
CAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCACCCAGCAGCGAGAAGTACGAGAACACCAAGA  
CCTGCCGCGGCCCGACGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGCCCGTGGACGTG

CTGGACGTGCCCCGAGGGCACCCCTGCCCCGACAAGCAGAGCACCGAGCAGGCCATCCA  
 GCTGCTGGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCTTCTTCTGCGCGTGGGCTACC  
 ACAAGCCCCACATCCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCCAGAAGCTGTACCCCCTGG  
 AGAACATCACCTGGCCCCCGACCCCGAGGTGCCCGACGGCCTGCCCCCGTGGCCT  
 ACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAGCGCGAGGACGTGCAGGCCCTGAACATCAGC  
 GTGCCCTACGGCCCCATCCCCTGGACTTCCAGCGCAAGATCCGCCAGAGCTACTTC  
 GCCAGCGTGAGCTACCTGGACACCCAGGTGGGCGCCTGCTGAGCGCCCTGGACGA  
 CCTGCAGCTGGCCAACAGCACCATCATCGCCTTACCAGCGACCACGGCTGGGCCCT  
 GGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAACTTCGACGTGGCCACCCACGTGC  
 CCCTGATCTTCTACGTGCCCGGCCGACCCGCCAGCCTGCCCGAGGCCGGCGAGAAG  
 CTGTTCCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCCAGCCAGCTGATGGAGCCCGGCCGC  
 CAGAGCATGGACCTGGTGGAGCTGGTGGAGCCTGTTCCCCACCCTGGCCGGCCTGGCC  
 GGCTGCAGGTGCCCCCGCTGCCCGTGCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGC  
 GAGGGCAAGAACCTGCTGAAGCACTTCCGCTTCCGCGACCTGGAGGAGGACCCCTA  
 CCTGCCCGGCAACCCCCGCGAGCTGATCGCCTACAGCCAGTACCCCCGCCCCAGCG  
 ACATCCCCCAGTGGAACAGCGACAAGCCCAGCCTGAAGGACATCAAGATCATGGGC  
 TACAGCATCCGCACCATCGACTACCGCTACACCGTGTGGGTGGGCTTCAACCCCGAC  
 GAGTTCCTGGCCAACTTCAGCGACATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTCGTGGACAGC  
 GACCCCTGCAGGACCACAACATGTACAACGACAGCCAGGGCGGGCAGCTGTTCCA  
 GCTGCTGATGCCCTAG

SEQ ID NO: 8

> Полноразмерный предшественник формилглицин-образующего фермента (FGE) Homo sapiens, мПНК

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTC  
 CTCTTGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGG  
 ACCGGTGCGGGCGCGGGGTCCCTTGCGGGTCTTGCGGCTGCGGCACGCCCCAGCG  
 GCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAACG  
 CTCCGGGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATC  
 CCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGATGATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGA  
 AGCACCTGCGAGGAGAGTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCTATGAAGTCAG  
 TAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACTCAACTGGCTATTTGACAGAGGCTGAGAA  
 GTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATAT  
 TCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCGCTAACTGGAG  
 ACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCATCCAGTTCTCCA  
 TGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCAC  
 GGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTGCGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCCT  
 GGGGCAACAACACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTATGCCAACATTTGGCAGGGCGAG  
 TTTCCGGTGACCAACACTGGTGGAGGATGGCTTCCAAGGAACTGCGCCTGTTGATGCC  
 TTCCCTCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACGCATGGGAATGGACT  
 TCAGACTGGTGGACTGTTTCATCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAAGGTCCC  
 CCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTACATGTGCCATAGGTCTTA  
 TTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTC  
 GAATCTGGGATTCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACCATGGACTGA

**[00130]** Обе нуклеотидные последовательности, кодирующие I2S и FGE, регулируются промотором CMV человека. Трансляция I2S мПНК приводит к синтезу 550-аминокислотного полноразмерного белка I2S (SEQ ID NO:2), который содержит 25-

аминокислотный сигнальный пептид. Сигнальный пептид удаляется, и растворимый фермент секретируется из клетки.

**[00131]** Кодировующую последовательность неомицин фосфотрансферазы (нео) бактерий и/или ген бластицицин S деаминазы (BSD) применили для того, чтобы сделать возможной селекцию трансфицированных клеток, применив аналог неомицина G418 и/или бластицицин, соответственно. Вдобавок, применили ген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR) в I2S- и/или FGE-кодирующем(их) векторе(ах) для того, чтобы сделать возможным выделение клеточных линий, содержащих повышенное количество копий I2S- и/или FGE-кодирующих последовательностей при помощи селекции с помощью метотрексата (MTX).

**[00132]** Клетки, вырабатывающие I2S, выделяли и проводили отбор по чувствительности к лекарственному препарату для того, чтобы выделить клетки с повышенным количеством копий трансфицированных генов I2S и/или FGE. Количественный анализ I2S проводили при помощи ELISA.

**[00133]** Клеточную популяцию также подвергали процедуре пошагового отбора в метотрексате (MTX) для того, чтобы выделить клетки с повышенной выработкой I2S. Выработку I2S отслеживали во время селекции с применением MTX при помощи ELISA.

**[00134]** После нескольких циклов культивирования несколько вырабатывающих I2S клонов подвергали суспензионной адаптации в бессывороточной среде с пошаговым снижением от DMEM, содержащей 10% телячью сыворотку, до бессывороточной химически определенной среды. При клонировании методом серийного разведения были получены несколько отдельных популяций клонов. Колонии отбирали по результатам анализа ферментативной активности I2S и ELISA. Две стабильные клеточные линии 2D и 4D демонстрировали высокий процент выживаемости и повышенную экспрессию I2S и были отобраны для дополнительного исследования.

## **Пример 2. Оценка стабильных клеточных линий, коэкспрессирующих рекомбинантные I2S и FGE**

**[00135]** Проводили дополнительные эксперименты для получения характеристик двух клеточных линий 2D и 4D, коэкспрессирующих I2S и FGE.

### *Специфическая активность*

**[00136]** Сначала оценивали специфическую активность фермента I2S. Анализ специфической активности фермента I2S, вырабатываемого клеточными линиями 2D и 4D,

проводили 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, полученный из человеческих клеточных линий I2S-AF 2D и 4D, инкубировали с раствором 4-метилумбеллиферил-сульфата (4-MUF-SO<sub>4</sub>), солью калия, Sigma Cat. # M-7133). Калибровку в данном анализе проводили, применяя 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. Применяя значения флуоресценции, полученные для каждого эталонного образца, процентный коэффициент вариации определяли при помощи следующего выражения:

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

**[00137]** 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:

$$mE / mЛ = (CE\Phi) \left( \frac{1 \text{ нмоль} / L}{10 E\Phi} \right) \left( \frac{1 Л}{10^3 \text{ мЛ}} \right) \left( \frac{2,11 \text{ мЛ}}{0,01 \text{ мЛ}} \right) \left( \frac{1 \text{ час}}{60 \text{ мин}} \right) \left( \frac{1 \text{ мЕ}}{1 \text{ нмоль}} \right) (KP)$$

CEΦ = отрицательная скорректированная средняя флуоресценция

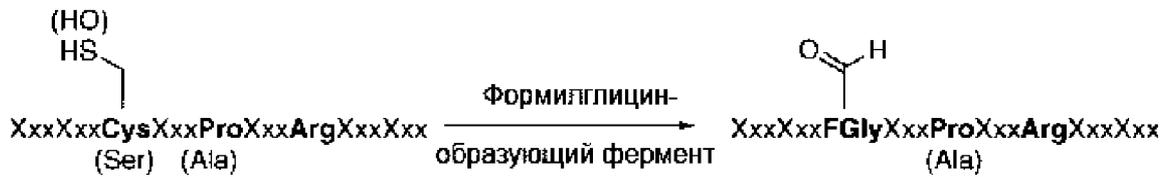
KP – кратность разведения

**[00138]** Одна миллиединица активности соответствует количеству фермента, необходимого для превращения одного наномоля 4-метилумбеллиферил-сульфата в 4-метилумбеллиферил за одну минуту при 37°C.

#### *Процент конверсии в формилглицин*

**[00139]** Для определения процента FGly-конверсии 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, используя следующую формулу:

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

[00140] Например, 50% ФГ означает то, что половина очищенного рекомбинантного I2S ферментативно неактивна и не оказывает терапевтического эффекта.

[00141] 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 HPLC. 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.

#### *Корреляция между процентом конверсии в FGly и специфической активностью*

[00142] Типовая корреляция между процентом конверсии в FGly и специфической активностью проиллюстрирована на Фигуре 3. Как видно, данные показывают, что более высокий процент конверсии в FGly приводит к более высокой ферментативной активности I2S.

*Карта гликанов*

[00143] Проводили определение состава гликанов рекомбинантного белка I2S, вырабатываемого клеточными линиями 2D и 4D. Количественную оценку состава гликанов проводили при помощи анионообменной хроматографии. Как описано ниже, карта гликанов рекомбинантного I2S, полученная в этих 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, полученный при применении бессывороточного способа клеточного культивирования (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 часов при  $37\pm 1^\circ\text{C}$  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 (HPLC-PAD), используя аналитическую колонку CarboPac PA1 Analytical Column 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 способ с использованием 48 мМ ацетата натрия в 100 мМ гидроксида натрия на протяжении как минимум 15 минут 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 Фигуре 4, на типовой карте гликанов для I2S, вырабатываемого клеточными линиями 2D и 4D, представлены типичные элюиционные 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.

### **Пример 3. Бессывороточное суспензионное клеточное культивирование**

**[00144]** Этот пример демонстрирует, что можно разработать способ бессывороточного суспензионного культивирования в больших масштабах для культивирования оптимизированной клеточной линии для получения рекомбинантного I2S.

#### *Система для бессывороточного суспензионного культивирования*

**[00145]** Вкратце, культуру для посева получали, применяя клеточную линию 2D или 4D из Примера 1. Клетки переносили в 250 мЛ качалку для тканевого культивирования, содержащую бессывороточную химически определенную среду для размножения с добавлением МТХ для селекции, доводили бикарбонатом натрия до рН 7,3 и выращивали при 37°C при 5% CO<sub>2</sub> на протяжении нескольких дней. Когда культура достигала достаточной клеточной плотности и жизнеспособности, исходную культуру для посева применяли для инокуляции первой группы для поэтапной экспансии клеточной культуры в 500 мЛ качалках для тканевого культивирования, а затем – в 1 Л качалках для тканевого культивирования.

**[00146]** Экспансию периодической культуры проводили путем перенесения каждой из 1 Л культур в 10 Л Cellbag bioreactor® (Wave Europe) и добавления среды для экспансии. После достижения достаточной клеточной плотности добавляли новую среду для экспансии и выращивали клетки до достаточной плотности. 10 Л Cellbag переносили в систему Wave bioreactor® (Wave Europe) и модифицировали условия культивирования, чтобы обеспечить возможность роста при непрерывной перфузии среды. Проводили доставку среды для роста и экспансии, а образцы собирали для анализа рН, глутамина, глутамата, глюкозы, аммония, лактата, рСО<sub>2</sub> и осмолярности в отсутствие метаболитов.

**[00147]** После достижения достаточной клеточной плотности всю 10 Л клеточную культуру переносили в 50 Л Wave Cellbag bioreactor®, содержащий свежую среду для экспансии, и выращивали до достаточной плотности, применяя систему Wave bioreactor®.

**[00148]** Затем проводили экспансию клеток, применяя 200 Л одноразовый биореактор и центрифужное перфузионное устройство (Centritech® CELL II unit, Pneumatic Scale Corporation), которое было сконструировано для концентрации клеток и очистки среды для повторного цикла во время перфузионно-опосредованного клеточного культивирования. Среду для экспансии (доведенную до рН 7,10) инокулировали частью 50 Л культуры и выращивали до достаточной клеточной плотности.

**[00149]** Далее часть 200 Л культуры применяли для посева в 2000 Л одноразовый биореактор и центрифужное перфузионное устройство (Centritech® CELL II unit, Pneumatic

Scale Corporation) в среду для серийного производства (доведенную до pH 7,20). Клетки выращивали в условиях для периодического роста. После двух дней выращивания условия корректировали с учетом непрерывной перфузии до достижения переходной фазы. Клетки выращивали в условиях для перфузионного роста на протяжении 24-часовой переходной фазы.

**[00150]** Для производственной фазы применяли два юнита Centritech CELL II. Производственную фазу начинали приблизительно через 24 часа после начала переходной фазы и продолжали на протяжении необходимого периода времени, регулируя скорость течения.

**[00151]** Хотя определенные компоненты, составы и способы, описанные в данном документе, были описаны в соответствии с определенными вариантами реализации изобретения, данные примеры служат исключительно для иллюстрирования компонентов изобретения и не ограничивают его.

**[00152]** Употребляемое в данном тексте в описании изобретения и в формуле изобретения единственное число, если четко не указано иное, подразумевает и множественные объекты. Пункты формулы изобретения или описания, которые содержат “или” между одним или более членов группы, считаются удовлетворительными, если один, более чем один или все члены группы присутствуют, задействованы или каким-либо другим способом связаны с данным продуктом или процессом, если не указано обратное или иное не очевидно из контекста. Изобретение включает варианты реализации, в которых только один член из группы присутствует, задействован или каким-либо другим способом связан с данным продуктом или процессом. Изобретение также включает варианты реализации, в которых более одного или все члены группы присутствуют, задействованы или каким-либо другим способом связаны с данным продуктом или процессом. Кроме того, стоит понимать, что изобретение включает все вариации, комбинации и перестановки, в которых одно или более ограничений, элементов, пунктов, описательных терминов и т.д. из одного или более перечисленных пунктов формулы изобретения вставлены в другой пункт, зависимый от того же основного пункта (или, в зависимости от содержания, от любого другого пункта), если не указано иное или если для специалиста в данной области техники очевидно, что может возникнуть противоречие или несогласованность. Там, где элементы представлены в виде списка (например, в виде группы Маркуша или в подобном формате), стоит понимать, что каждая подгруппа элементов также раскрывается, а любой(ые) элемент(ы) можно удалить из группы. Стоит понимать, что, в общем случае, там, где говорится, что изобретение или аспекты изобретения содержит/содержат конкретные

элементы, признаки и т.д., определенные варианты реализации изобретения или аспекты изобретения состоят или преимущественно состоят из таких элементов, признаков и т.д. Для упрощения в данном тексте такие варианты реализации изобретения не были отдельно подробно описаны в каждом из случаев. Также стоит понимать, что любой вариант реализации или аспект изобретения может быть полностью исключен из формулы изобретения вне зависимости от того, присутствует ли это конкретное исключение в описании изобретения или нет. Публикации, вебсайты и другие ссылочные материалы, упоминаемые в данном тексте для описания уровня техники изобретения и дополнительных подробностей в отношении его практической реализации, включены в данный текст посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Клетка для получения идуронат-2-сульфатазы (I2S), содержащая:  
первую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок идуронат-2-сульфатазы (I2S),  
содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%  
идентичную SEQ ID NO:1, и  
вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок формилглицин-образующего  
фермента (FGE), содержащий аминокислотную последовательность, по  
меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:5;  
при этом первая и/или вторая нуклеиновая кислота являются экзогенными, а клетка  
при культивировании в условиях клеточного культивирования, экспрессирует  
мРНК I2S на уровне, который в от 0,1 до 10 раз выше, чем уровень мРНК FGE,  
экспрессируемой клеткой, и  
при этом клетка вырабатывает белок I2S, содержащий по меньшей мере около 70%  
остатков цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных  
в C $\alpha$ -формилглицин (FGly).
2. Клетка по п. 1, отличающаяся тем, что клетка при культивировании в условиях  
клеточного культивирования вырабатывает белок I2S, содержащий по меньшей мере 80%,  
по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% остатков  
цистеина, соответствующих Cys59 из SEQ ID NO:1, преобразованных в FGly.
3. Клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что первая и/или вторая нуклеиновая  
кислота функционально связана с промотором hCMV.
4. Клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что первая нуклеиновая кислота  
содержит последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO:7.
5. Клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что вторая нуклеиновая кислота  
содержит последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO:8.
6. Клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что как первая, так и вторая  
нуклеиновые кислоты являются экзогенными.

7. Клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что первая и/или вторая нуклеиновые кислоты интегрированы в геном клетки.
8. Клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что первая и/или вторая нуклеиновые кислоты находятся в одной или более внехромосомных конструкциях.
9. Клетка по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что клетка является клеткой млекопитающего.
10. Клетка по п. 9, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего является клеткой человека или клеткой СНО.
11. Клетка по любому из пп. 1-10, характеризующаяся тем, что первая нуклеиновая кислота кодирует белок идуронат-2-сульфатазы (I2S), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере 95% идентичную или полностью идентичную SEQ ID NO:1.
12. Клетка по любому из пп. 1-11, характеризующаяся тем, что вторая нуклеиновая кислота кодирует белок формилглицин-образующего фермента (FGE), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную или полностью идентичную SEQ ID NO:5.
13. Клетка по любому из пп. 1-12, характеризующаяся тем, что клетка вырабатывает I2S при уровне удельной продуктивности больше, чем 5 пикограмм/клетку/день.
14. Способ получения рекомбинантного белка идуронат-2-сульфатазы (I2S), включающий культивирование клетки по любому из пп. 1-15 в таких условиях, в которых рекомбинантные белки I2S и FGE коэкспрессируются в клетке.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что клетку культивируют в процессе, проходящем в биореакторе.
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что объем биореактора выбран из 10 л, 200 л, 500 л, 1000 л, 1500 л или 2000 л.

17. Способ по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что культивирование является перфузионным процессом или процессом, проходящим в роллерном флаконе.

18. Способ по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что клетки культивируют в бессывороточной среде.

19. Способ по любому из пп. 14-18, отличающийся тем, что клетки культивируют в суспензии.

20. Способ по любому из пп. 14-19, отличающийся тем, что способ дополнительно включает этап очистки рекомбинантного белка I2S.

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

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

**Asn**  
**Cys**

- указывает на участки N-связанного гликозипирования

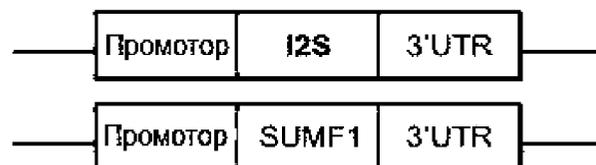
- типовой участок конверсии цистеина

ФИГ. 1В

ФИГ. 2А

Варианты коэкспрессии I2S и SUMF1

Экспрессионные единицы на отдельных векторах (котрансфекция или последовательные трансфекции)



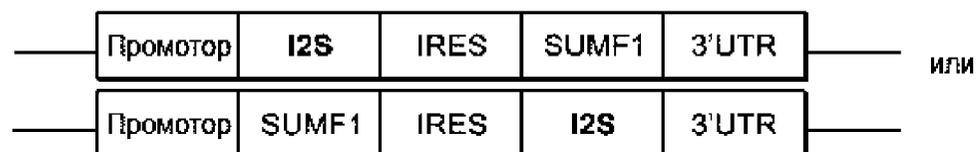
ФИГ. 2В

Экспрессионные единицы на одном векторе (одна трансфекция)

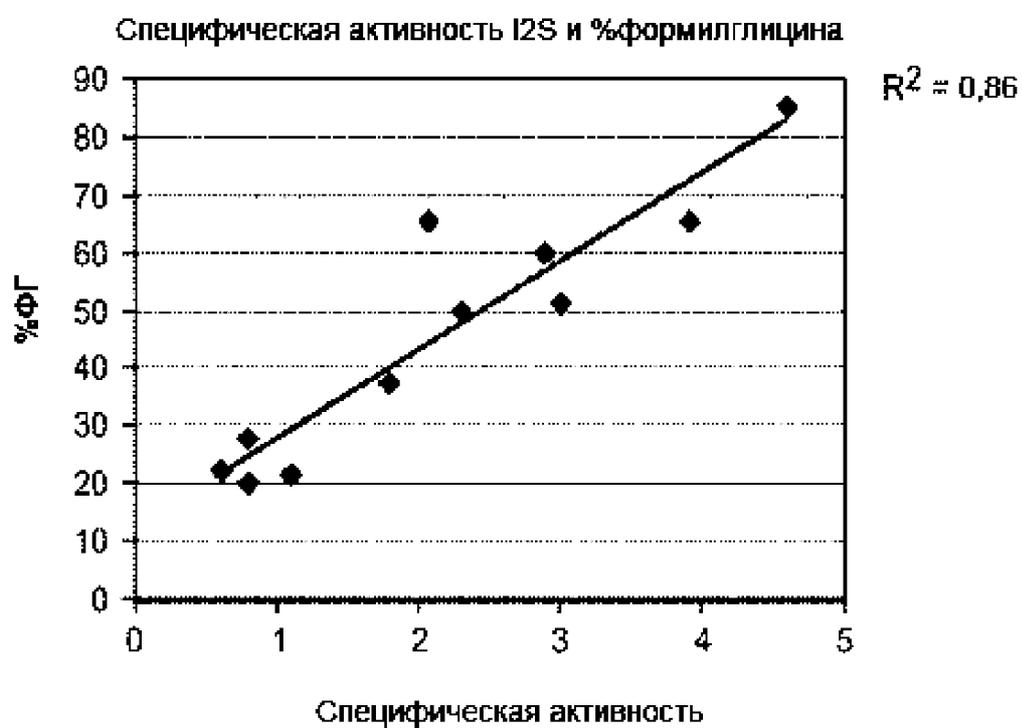
1) Отдельные цистроны



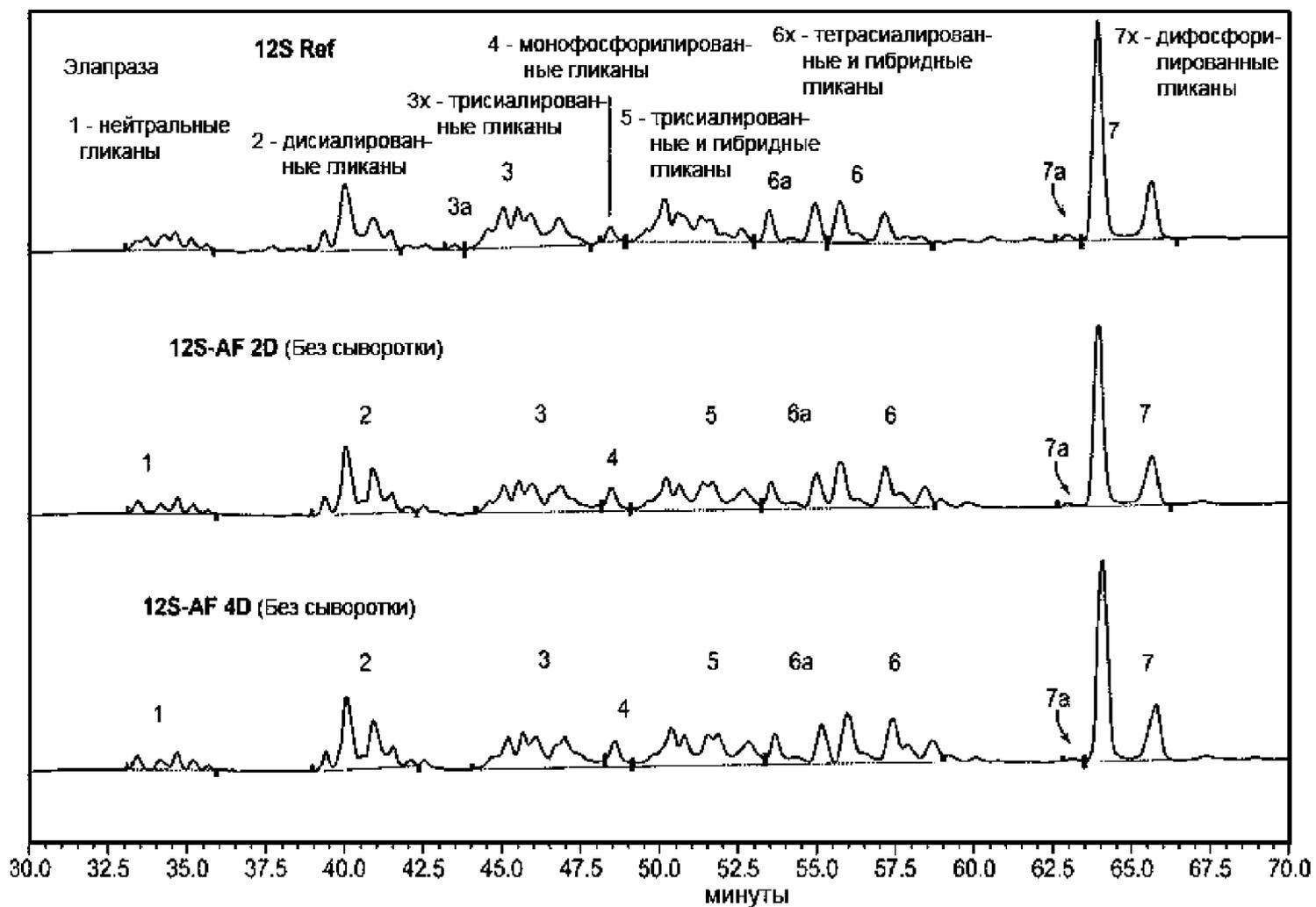
2) Транскрипционно связанные цистроны



Корреляция между специфической активностью и коэффициентом конверсии в формилглицин



ФИГ. 3



ФИГ. 4

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202090805****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

C12N 9/16 (2006.01)  
 C12N 15/85 (2006.01)  
 C12P 21/06 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 9/16, 15/85, C12P 21/06

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2004/072275 A2 (TRANSKARYOTIC THERAPIES, INC.) 26.08.2004 с. 4-13, 54-66, формула	1-20
A	WO 2011/044542 A1 (ARMAGEN TECHNOLOGIES, INC. et al.) 14.04.2011, параграфы [0003], [0099], [00161], [00183], формула	1-20
A	GenBank: AAA16877.1 [онлайн база данных] [найдено 2020-08-16] Найдено из <locus HUMIDSGEN1 accession L13321.1 - locus HUMIDSGEN9 accession L13329.1, 18.03.1994>, последовательность	1-20
A	NCBI Reference Sequence: NP_877437.2 [онлайн база данных] [найдено 2020 -08-16] Найдено из <REFSEQ: accession NM_182760.3, 30.04.2012>, последовательность	1-20

 последующие документы указаны в продолжении

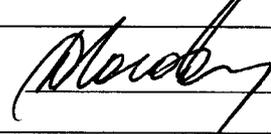
\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
 «D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
 «E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
 «O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
 "P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
 «X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
 «Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
 «&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
 «L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **05/10/2020**

Уполномоченное лицо:  
 Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин