

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2013107765/10, 22.07.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.07.2010 US 61/366,714

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2014 Бюл. № 24

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.02.2013(86) Заявка РСТ:
US 2011/045011 (22.07.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/012718 (26.01.2012)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**БАЙОМАРИН ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**КОППАКА Виш (US),
ВЕЛЛАР Мишель Клод (US),
ОКХАМАФЕ Аугустус О. (US),
АРАЙА Кидисти (US)**(54) **ПРОИЗВОДСТВО АКТИВНОЙ ВЫСОКОФОСФОРИЛИРОВАННОЙ N-
АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИН-6-СУЛЬФАТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(57) Формула изобретения

1. Способ очистки рекомбинантного фермента N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, при этом указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO:4, и:

(i) имеет чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях,

(ii) имеет по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_α-формилглицин (FGly), и

(iii) необязательно имеет от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

и при этом по меньшей мере 97% указанного фермента GALNS представлен в форме предшественника, как это определено SDS-капиллярным гель-электрофорезом (SDS-CGE), включающий:

а) фильтрацию питательной среды, содержащей фермент GALNS, секретируемый из линии клеток млекопитающего, экспрессирующей фактор модификации сульфатазы человека 1 (SUMF1) и рекомбинантный фермент GALNS человека, ультрафильтрацию/диафильтрацию профильтрованной питательной среды, и фильтрацию через активированный уголь питательной среды, прошедшей ультрафильтрацию/

диафильтрацию;

б) загрузку питательной среды, прошедшей фильтрацию активированным углем, ультрафильтрацию/диафильтрацию, из этапа а) в улавливающую колонку, промывание улавливающей колонки в условиях, при которых фермент GALNS удерживается в улавливающей колонке, и элюирование фермента GALNS из удерживающей колонки;

в) необязательно, фильтрацию элюата из улавливающей колонки из этапа б) через фильтр для удаления вирусов;

г) корректирование уровня pH элюата из улавливающей колонки из этапа б) или фильтрата из этапа в) к кислому значению pH, и фильтрацию элюата с кислым скорректированным pH из улавливающей колонки или фильтрата со скорректированным кислым pH;

д) загрузку элюата с кислым скорректированным pH из улавливающей колонки или фильтрата Q с кислым скорректированным pH из этапа г) в промежуточную колонку, промывание промежуточной колонки в условиях, при которых фермент GALNS остается в промежуточной колонке, и элюирование фермента GALNS из промежуточной колонки;

е) корректировку pH элюата из промежуточной колонки из этапа д) к более низкому для вирусной инактивации; и

ж) загрузку элюата с низким pH для вирусной инактивации из этапа е) в полирующую колонку, промывание полирующей колонки в условиях, при которых фермент GALNS удерживается в полирующей колонке, и элюирование фермента GALNS из полирующей колонки.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что питательная среда сконцентрирована примерно в 20 раз на этапе а).

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фильтр из активированного угля из этапа а) является фильтром с активированным углем Zeta Plus R55.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что улавливающая колонка из этапа б) является колонкой для Zn-иммобилизированной аффинной хроматографии с металлом (Zn-IMAC).

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что колонка Zn-IMAC является Zn-хелатной колонкой с сефарозой FF.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выполняют этап в), фильтр является фильтром Mustang Q.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что значение pH элюата из улавливающей колонки из этапа б) или фильтрата из этапа в) скорректировано на этапе г) до примерно $4,5 \pm 0,1$.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что промежуточная колонка из этапа д) является катионообменной колонкой.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что катионообменная колонка является колонкой Fractogel EMD SE HiCap.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что кислое значение pH для вирусной инактивации корректируют на этапе е) до примерно $3,5 \pm 0,1$.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полирующая колонка из этапа ж) является хроматографической колонкой с гидрофобным взаимодействием (ХГВ).

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что колонка ХГВ является колонкой ToyoPearl Butyl 650M.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно включает:

з) буфер-обмен элюата из полирующей колонки из этапа ж) в композицию;

и) удаление любого остаточного вируса и ДНК путем фильтрации подвергнутой буфер-обмену композиции из этапа з) вирусным фильтром и фильтром ДНК; и

к) добавление неонинного сурфактанта к композиции из этапа и).

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что композиция из этапа з) включает 20 мМ NaOAc/HOAc, 50 мМ NaH_2PO_4 , 30 мМ аргинина HCl, 2% (в/о) сорбитол, pH 5,4.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что фермент GALNS в композиции из этапа з) скорректирован до примерно 3 мг/мл.

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что вирусный фильтр из этапа и) является фильтром DV20 и фильтр ДНК из этапа и) является фильтром Mustang Q.

17. Способ по п. 13, отличающийся тем, что неоионный сурфактант из этапа к) является полисорбатом 20 (ПС20), при этом концентрация ПС20 в финальной композиции составляет 0,01% (в/о).

18. Способ очистки рекомбинантного фермента N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, при этом такой фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27 - 522 последовательности SEQ ID NO:4, и

(i) имеет чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях,

(ii) имеет по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_α -формилглицин (FGly), и

(iii) необязательно, имеет от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

и при этом по меньшей мере 97% указанного фермента GALNS представлен в форме предшественника, как это определено путем SDS-CGE, включающий:

а) фильтрацию питательной среды, содержащей фермент GALNS, секретируемый из линии клеток млекопитающего, экспрессирующих фактор модификации сульфатазы человека 1 (SUMF1) и рекомбинантный фермент GALNS человека, ультрафильтрацию/диафильтрацию профильтрованной питательной среды, при этом питательная среда, прошедшая ультрафильтрацию/диафильтрацию, сконцентрирована примерно в 20 раз, и фильтрацию через активированный уголь питательной среды, прошедшей ультрафильтрацию/диафильтрацию и сконцентрированной в 20 раз;

б) загрузку питательной среды, сконцентрированной до 20 раз и прошедшей ультрафильтрацию/диафильтрацию и фильтрацию активированным углем, из этапа а) в Zn-хелатную улавливающую колонку с сефарозой FF, промывание колонки в условиях, при которых фермент GALNS удерживается в колонке, и элюирование фермента GALNS из колонки;

в) необязательно, фильтрацию элюата из Zn-хелатной улавливающей колонки с сефарозой FF из этапа б) через фильтр для удаления вирусов;

г) корректировку pH элюата из Zn-хелатной улавливающей колонки с сефарозой FF из этапа б) или фильтрата из этапа в) до примерно pH $4,5 \pm 0,1$, и фильтрацию элюата с скорректированным pH до 4,5 из Zn-хелатной улавливающей колонки с сефарозой FF или фильтрата;

д) загрузку элюата с скорректированным pH до 4,5 из Zn-хелатной улавливающей колонки FF или фильтрата из этапа г) в катионообменную колонку Fractogel EMD SE Hi-Cap, промывание колонки в условиях, при которых фермент GALNS остается в колонке, и элюирование фермента GALNS из колонки;

е) корректировку pH элюата из катионообменной колонки Fractogel EMD SE Hi-Cap из этапа д) до примерно pH $3,5 \pm 0,1$ для вирусной инактивации;

ж) загрузку элюата с инактивированными вирусами и pH 3,5 из этапа е) в полирующую колонку ToyoPearl Butyl 650 M, промывание колонки в условиях, при которых фермент GALNS удерживается в колонке, и элюирование фермента GALNS из колонки;

з) буфер-обмен элюата из полирующей колонки ToyoPearl Butyl 650 M из этапа ж) в

композицию, включающую 20 мМ NaOAc/HOAc, 50 мМ NaH₂PO₄, 30 мМ аргинин HCl, 2% (в/о) сорбитол, pH 5,4, и корректировку концентрации фермента GALNS в композиции до примерно 3 мг/мл;

и) удаление любого остаточного вируса и/или ДНК фильтрацией подвергнутой буфер-обмену композиции из этапа з) с фильтром DV20 и фильтром Mustang Q; и

к) добавление полисорбата 20 (ПС20) к композиции из этапа и) до финальной концентрации 0,01% (в/о).

19. Композиция, очищенная способом по п.1 или 18, отличающаяся тем, что включает рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, при этом указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO:4, и:

(i) имеет чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях,

(ii) имеет по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_α-формилглицин (FGly), и

(iii) необязательно имеет от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

и при этом по меньшей мере 98% указанного фермента GALNS представлено в форме предшественника, как это определено путем SDS-CGE.

20. Способ лечения субъекта, страдающего мукополисахаридозом типа IVa (МПС IVa) или синдромом Моркио типа А, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, очищенной по п. 1 или 18 и включающей очищенный рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, при этом указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO:4, и:

(i) имеет чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях,

(ii) обладает по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_α-формилглицин (FGly), и

(iii) необязательно, имеет от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

и при этом по меньшей мере 98% указанного фермента GALNS представлен в форме предшественника, как это определено путем SDS-CGE.

21. Композиция, включающая

(а) рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, включающий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO:4, и

(i) имеющая чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях,

(ii) имеющая по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_α-формилглицин (FGly), и

(iii) необязательно имеющая от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

и при этом по меньшей мере 97% указанного фермента GALNS представлено в форме предшественника, как это определено путем SDS-CGE, и

(б) один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или

вспомогательных веществ, включающих:

(i) количество фосфатного буфера, эффективного для снижения дефосфорилирования указанного фермента GALNS; и

(ii) стабилизирующее количество одного или более стабилизаторов, выбранных из группы, состоящей из солей аминокислот, буферов аминокислот, сурфактантов и полиолов;

при этом указанная композиция имеет значение pH примерно 5,0-5,8.

22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что фосфатный буфер в композиции представлен в концентрации между примерно 25 мМ и 75 мМ.

23. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что композиция дополнительно включает второй буфер, необязательно ацетатный буфер.

24. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что стабилизатор является буфером или солью аргинина или гистидина, необязательно аргинина гидрохлоридом.

25. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что стабилизатор является полисорбатом, необязательно полисорбатом 20.

26. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что стабилизатор является трехатомным или высшим сахароспиртом, необязательно сорбитолом.

27. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что включает буфер или соль аргинина, полисорбат и полиол.

28. Способ предотвращения дефосфорилирования рекомбинантного фермента GALNS человека, включающий смешивание фермента GALNS и фосфатного буфера до финальной концентрации фосфатного буфера между примерно 25 мМ и 75 мМ.

29. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что чистота фермента GALNS составляет по меньшей мере 95%, как это определено ОФ-ВЭЖХ.

30. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что от 50% до 80% фермента GALNS связывается с рецептором маннозо-6-фосфата в колонке.

31. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что фермент GALNS обнаруживает захват (К-захват) фибробластами в количестве примерно 1-5 нМ.

32. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что фермент GALNS обнаруживает специфический захват (К-захват) фибробластами в количестве примерно 1-3,5 нМ.

33. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что концентрация фермента GALNS составляет от примерно 0,5 до 1,5 мг/мл.

34. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что буферные агенты являются NaOAc/HOAc и NaH_2PO_4 .

35. Композиция по п. 34, отличающаяся тем, что концентрация NaOAc/HOAc составляет от примерно 10 до 30 мМ, и концентрация NaH_2PO_4 составляет от примерно 25 до 75 мМ.

36. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что стабилизаторы являются аргинином HCl, Твин-20 и сорбитолом.

37. Композиция по п. 36, отличающаяся тем, что концентрация аргинина HCl составляет от примерно 10 до 50 мМ, концентрация Твин-20 составляет от примерно 0,005% до 0,015% (в/о), а концентрация сорбитола составляет от примерно 1,0% до 3,0% (в/о).

38. Композиция, включающая

(а) рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, при этом указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO:4, и

(i) имеющая чистоту по меньшей мере примерно 95%, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в

невосстанавливающих условиях,

(ii) обладающая по меньшей мере примерно 50% конверсии остатка цистеина в положении 53 в C_{α} -формилглицин (FGly), и

(iii) имеющая от 0,5 до 0,8 бис-фосфорилированных олигоманнозных цепей на мономерную белковую цепь,

при этом по меньшей мере 97% указанного фермента GALNS представлено в форме предшественника, как это определено окрашиванием Кумасси-синим при проведении анализа SDS-PAGE в восстанавливающих условиях, и

(б) один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ, включающих:

(i) NaOAc/HOAc и NaH_2PO_4 в качестве буферных агентов;

(ii) аргинин HCl, Твин-20 и сорбитол в качестве стабилизаторов; и

(iii) pH примерно $5,4 \pm 0,4$.

39. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что чистота фермента GALNS составляет по меньшей мере 95%, как это определено ОФ-ВЭЖХ.

40. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что от 50% до 80% фермента GALNS связывается в колонке с рецептором маннозо-6-фосфата.

41. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что фермент GALNS обнаруживает специфический захват (К-захват) фибробластами в количестве примерно 1-5 нМ.

42. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что фермент GALNS обнаруживает специфический захват (К-захват) фибробластами в количестве примерно 1-3,5 нМ.

43. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что концентрация фермента GALNS составляет примерно $1,0 \pm 0,5$ мг/мл.

44. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что концентрация NaOAc/HOAc составляет примерно 20 ± 10 mM, и концентрация NaH_2PO_4 составляет примерно 50 ± 25 mM.

45. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что концентрация аргинина HCl составляет примерно 30 ± 20 mM, концентрация Твин-20 составляет примерно $0,01\% \pm 0,005\%$ (в/о), а концентрация сорбитола составляет примерно $2,0\% \pm 1,0\%$ (в/о).

46. Композиция по п. 45, отличающаяся тем, что концентрация NaOAc/HOAc составляет примерно 20 ± 10 mM, а концентрация NaH_2PO_4 составляет примерно 50 ± 25 mM.