



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201410868 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：102123353

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl. : *C12N9/16 (2006.01)* *A61K38/46 (2006.01)*
C07K1/16 (2006.01) *B01D15/08 (2006.01)*

(30)優先權：2012/06/29 美國 61/666,733

(71)申請人：舒爾人類基因療法公司 (美國) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)
美國

(72)發明人：尼可拉斯 戴夫 NICHOLS, DAVE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：67 項 圖式數：11 共 93 頁

(54)名稱

艾杜糖醛酸鹽－2－硫酸酯酶之純化

PURIFICATION OF IDURONATE-2-SULFATASE

(57)摘要

本發明尤其提供一種純化重組產生之 I2S 蛋白質用於酶替代療法之改良方法。本發明部分係基於驚人地發現：重組 I2S 蛋白質可自未經處理生物材料(例如，含 I2S 細胞培養基)使用只要涉及四個層析管柱之製程來純化。

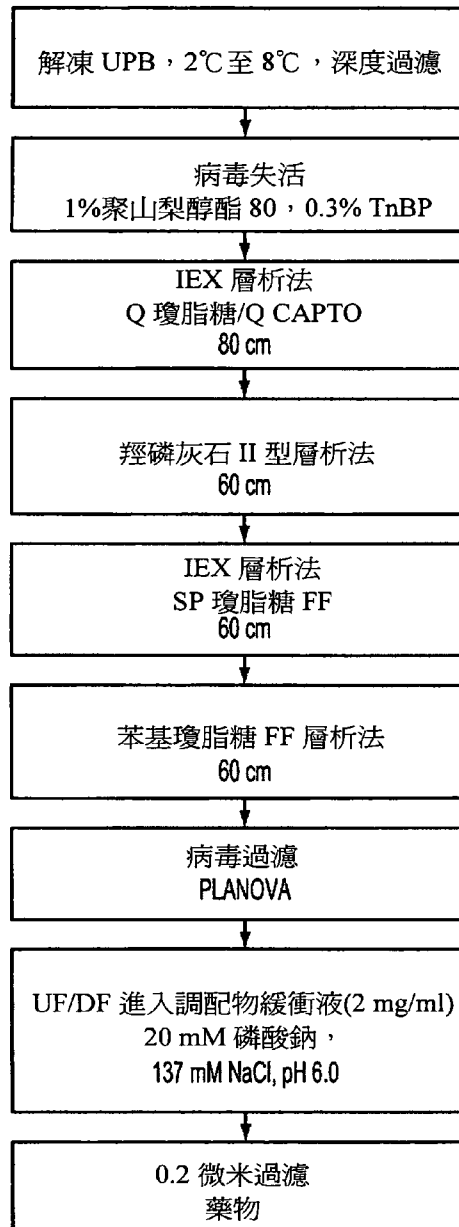


圖 1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201410868 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：102123353

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl. : *C12N9/16 (2006.01)* *A61K38/46 (2006.01)*
C07K1/16 (2006.01) *B01D15/08 (2006.01)*

(30)優先權：2012/06/29 美國 61/666,733

(71)申請人：舒爾人類基因療法公司 (美國) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)
美國

(72)發明人：尼可拉斯 戴夫 NICHOLS, DAVE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：67 項 圖式數：11 共 93 頁

(54)名稱

艾杜糖醛酸鹽－2－硫酸酯酶之純化

PURIFICATION OF IDURONATE-2-SULFATASE

(57)摘要

本發明尤其提供一種純化重組產生之 I2S 蛋白質用於酶替代療法之改良方法。本發明部分係基於驚人地發現：重組 I2S 蛋白質可自未經處理生物材料(例如，含 I2S 細胞培養基)使用只要涉及四個層析管柱之製程來純化。

發明摘要

※ 申請案號： 102/23353

C12N 9/16 (2006.01)

※ 申請日： 102. 6. 28

※IPC 分類：A61K 38/46 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

【發明名稱】

艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶之純化

PURIFICATION OF IDURONATE-2-SULFATASE

【中文】

○ 本發明尤其提供一種純化重組產生之I2S蛋白質用於酶替代療法之改良方法。本發明部分係基於驚人地發現：重組I2S蛋白質可自未經處理生物材料(例如，含I2S細胞培養基)使用只要涉及四個層析管柱之製程來純化。

【英文】

The present invention provides, among other things, improved methods for purifying I2S protein produced recombinantly for enzyme replacement therapy. The present invention is, in part, based on the surprising discovery that recombinant I2S protein can be purified from unprocessed biological materials, such as, I2S-containing cell culture medium, using a process involving as few as four chromatography columns.

○

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶之純化

PURIFICATION OF IDURONATE-2-SULFATASE

相關申請案交叉參照

本申請案主張對2012年6月29日申請之美國臨時專利申請案第61/666,733號的優先權；其全文係以引用方式併入本文中。

序列表

本說明書參照於2013年6月27日以作為名為「2006685-0342_SEQ_LIST」之ASCII .txt檔案之電子形式提交之序列表。該.txt檔案係於2013年6月25日生成且大小為15 KB。序列表之全部內容係以引用方式併入本文中。

【先前技術】

II型黏多糖貯積症(MPS II，韓特氏症候群(Hunter syndrome))係因艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)缺陷引起之X-染色體連鎖隱性溶酶體貯積症。I2S裂解糖胺聚糖(GAG)硫酸皮膚素及硫酸乙醯肝素之末端2-O-硫酸酯部分。由於在韓特氏症候群患者中I2S酶缺失或缺陷，GAG在多種類型之細胞的溶酶體中逐漸累積，從而導致細胞充血、器官腫大、組織破壞及器官系統功能失調。

一般而言，韓特氏症候群患者之身體表現包括身體症狀及神經症狀二者。例如，在韓特氏症候群之一些病例中，涉及中樞神經系統導致發育延遲及神經系統問題。儘管韓特氏症候群之非神經症狀在出生時一般不存在，但GAG在身體細胞中隨時間逐漸累積可對身體之周圍組織造成巨大影響。GAG在周圍組織中之累積導致患者之面部特徵

非常粗糙且導致前額突出、鼻樑扁平及巨舌，其皆係韓特症患者之定義性標誌。類似地，GAG之累積可對身體之器官系統造成不良影響。首先表現為心臟、肺及氣道壁增厚以及肝、脾及腎之異常增大，該等深度變化可最終導致廣泛的災難性器官衰竭。因此，韓特氏症候群總是嚴重的、進行性的且會縮短壽命。

酶替代療法(ERT)係已批准用於治療韓特氏症候群(MPS II)之療法，其涉及將外源替代性I2S酶投與韓特氏症候群患者。

【發明內容】

本發明尤其提供用於純化重組產生之I2S蛋白質用於酶替代療法之改良方法。本發明部分係基於以下驚人發現：重組I2S蛋白質可自未經處理生物材料(例如，含I2S細胞培養基)使用涉及少至四個層析管柱之製程來純化。用於酶替代療法之重組I2S之現有已批准純化製程涉及6個層析管柱。如實例部分中所闡述，根據本發明使用四管柱製程純化之重組I2S蛋白質符合US及許多其他國家之市場純度要求。另外，根據本發明純化之重組I2S酶保留高百分比之C_α-甲醯甘胺酸(FGly) (例如，高於70%且至多100%)，其對於I2S酶之活性甚為重要，且諸如唾液酸含量及聚糖圖譜等鮮明特徵可促進重組I2S蛋白質之生物可用度及/或溶酶體靶向。因此，本發明提供用於純化重組I2S蛋白質之有效、較便宜且較快速之製程。本發明可特別用於純化於無血清培養基中所產生之重組I2S蛋白質。

因此，在一態樣中，本發明提供使用基於陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析法中之一或多者之製程自不純製劑純化重組I2S蛋白質的方法。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及少於6個(例如，少於5個、少於4個或少於3個)層析步驟。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及2個、3個、4個或5個層析步驟。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及4個層

析步驟。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質含有少於100 ng/mg宿主細胞蛋白(HCP) (例如，少於90 ng/mg HCP、少於80 ng/mg HCP、少於70 ng/mg HCP、少於60 ng/mg HCP、少於50 ng/mg HCP、少於40 ng/mg HCP、少於30 ng/mg HCP、少於20 ng/mg HCP、少於10 ng/mg HCP)。

在一些實施例中，適宜陰離子交換層析法為Q層析法。在一些實施例中，適宜陽離子交換層析法為SP層析法。在一些實施例中，適宜混合模式層析法為羧磷灰石(HA)層析法。在一些實施例中，適宜疏水作用層析法為苯基層析法。

預期可以任何順序實施陰離子交換層析法(例如，O管柱)、陽離子交換層析法(例如，SP管柱)、混合模式層析法(例如，HA管柱)及疏水作用層析法(例如，苯基管柱)。在一些實施例中，本發明方法係以陰離子交換層析法(例如，O管柱)、陽離子交換層析法(例如，SP管柱)、混合模式層析法(例如，HA管柱)及疏水作用層析法(例如，苯基管柱)之順序實施。

在一些實施例中，在裝載至陰離子交換層析管柱(例如，Q管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之pH調整至約5.0至7.0 (例如，約5.0、5.5、6.0、6.5或7.0)且將導電率調整至約10 mS/cm至20 mS/cm (例如，10 mS/cm、11 mS/cm、12 mS/cm、13 mS/cm、14 mS/cm、15 mS/cm、16 mS/cm、17 mS/cm、18 mS/cm、19 mS/cm或20 mS/cm)。在一些實施例中，使用1M乙酸鈉調整pH。在一些實施例中，使用5 M氯化鈉調整導電率。在一些實施例中，在裝載時使用包含濃度在約140 mM至200 mM之範圍內(例如，約140 mM、145 mM、150 mM、155 mM、160 mM、165 mM、170 mM、175 mM、180 mM、185 mM、190 mM、195 mM或200 mM)之鹽(例如，NaCl)且pH為約5.0至7.0 (例如，約5.0、5.5、6.0、6.5或7.0)之洗滌緩衝液洗滌陰

離子交換層析管柱。在一些實施例中，使用包含線性鹽(例如，NaCl)梯度之溶析緩衝液溶析陰離子交換層析管柱。在一些實施例中，適宜線性NaCl梯度含有約0 mM至500 mM NaCl (例如，約0 mM至400 mM、約0 mM至350 mM、約0 mM至300 mM、約50 mM至500 mM、約150 mM至500 mM、約150 mM至450 mM、約150 mM至400 mM)之範圍。

在一些實施例中，在裝載至陽離子交換層析管柱(例如，SP管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之導電率調整至介於約1 mS/cm與20 mS/cm之間(例如，介於約1 mS/cm與15 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與10 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與8 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與6 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與4 mS/cm之間、介於約2 mS/cm與4 mS/cm之間)範圍內。在一些實施例中，在裝載至陽離子交換層析管柱(例如，SP管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之導電率調整至介於約2 mS/cm與4 mS/cm之間範圍內(例如，2 mS/cm、2.5 mS/cm、3 mS/cm、3.5 mS/cm或4 mS/cm)。在一些實施例中，藉由以約1至2:1 (例如，1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1或2:1)之比率用H₂O稀釋來自陰離子交換層析管柱之析出液來調整導電率。在一些實施例中，藉由滲濾調整導電率。在一些實施例中，在約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0或6.5)之pH下運行陽離子交換層析管柱。在一些實施例中，利用包含濃度在約0.01 M至約0.1 M之範圍內(例如，約0.01 M、0.02 M、0.03 M、0.04 M、0.05 M、0.06 M、0.07 M、0.08 M、0.09 M或0.1 M)之磷酸鹽(例如，NaPO₄)之緩衝液運行陽離子交換層析管柱。在一些實施例中，適宜pH為約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0或6.5)。

在一些實施例中，在裝載混合模式層析管柱(例如，HA管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之磷酸鹽(例如，NaPO₄)濃度

調整至在約0.001 M至約0.01 M之範圍內(例如，約0.001 M、0.002 M、0.003 M、0.004 M、0.005 M、0.006 M、0.007 M、0.008 M、0.009 M或0.01 M)且將pH調整至約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0或6.5)。在一些實施例中，在裝載時，利用含有磷酸鹽(例如，1 mM至10 mM磷酸鈉或磷酸鉀)且在中性pH下或附近之洗滌緩衝液洗滌混合模式層析管柱(例如，HA管柱)。在一些實施例中，利用磷酸鹽濃度在約10 mM至20 mM (例如，約10 mM至18 mM、10 mM至16 mM、10 mM至15 mM、12 mM至20 mM、14 mM至18 mM、14 mM至16 mM)之範圍內之洗滌緩衝液洗滌經裝載混合模式層析管柱(例如，HA管柱)。在一些實施例中，利用磷酸鹽濃度為或高於10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM之洗滌緩衝液洗滌經裝載混合模式層析管柱(例如，HA管柱)。在一些實施例中，利用梯度磷酸鹽緩衝液達成自混合模式層析管柱(例如，HA管柱)之溶析。在一些實施例中，適宜溶析緩衝液可具有大約1 mM至400 mM (例如，1 mM至300 mM、1 mM至200 mM、1 mM至150 mM、1 mM至100 mM、10 mM至350 mM、10 mM至300 mM、10 mM至250 mM、10 mM至200 mM、10 mM至150 mM、10 mM至140 mM、10 mM至130 mM、10 mM至120 mM、10 mM至110 mM、10 mM至100 mM、10 mM至90 mM、10 mM至80 mM、10 mM至70 mM、10 mM至60 mM、10 mM至50 mM)磷酸鈉或磷酸鉀之磷酸鹽梯度。在一些實施例中，藉由逐步提高溶析緩衝液中之磷酸鹽濃度來達成自HA管柱之溶析。在一些實施例中，逐步溶析緩衝液可具有選自10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM之磷酸鹽(例如，磷酸鈉)濃度。在一些實施例中，藉由磷酸鹽(例如，磷酸鈉)濃度在約50 mM

mM至150 mM之範圍內(例如，選自50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM及其組合之磷酸鹽(例如，磷酸鈉)濃度)之溶析緩衝液達成自混合模式層析管柱(例如，HA管柱)之溶析。

在一些實施例中，在裝載至疏水作用層析管柱(例如，苯基管柱)上之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之鹽(例如，NaCl)濃度調整至在約0.5 M至約2.0 M之範圍內(例如，約0.5 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M或2.0 M NaCl)且將之pH調整至約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)。在一些實施例中，在裝載時，使用包含濃度在約0.5 M至2.0 M之範圍內(例如，約0.5 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M或2.0 M NaCl)之鹽(例如，NaCl)且在約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)之pH下之洗滌緩衝液洗滌疏水作用層析管柱。在一些實施例中，使用包含濃度在約0.1 M至約0.5 M之範圍內(例如，約0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M或0.5 M NaCl)之鹽(例如，NaCl)且在約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)之pH下之溶析緩衝液溶析疏水作用層析管柱。

在一些實施例中，陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析管柱中之每一者皆具有在14 cm至25 cm (例如，15 cm至25 cm、15 cm至20 cm、14 cm至24 cm、14 cm至22 cm、14 cm至20 cm或16 cm至18 cm)之範圍內之高度。在一些實施例中，陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析管柱中之每一者皆具有大約14 cm、15 cm、16 cm、17 cm、18 cm、19 cm、20 cm、21 cm、22 cm、23 cm、24 cm或25 cm之高度。

在一些實施例中，本發明之發明性方法包括在將不純製劑裝載

至第一層析管柱上之前先使病毒失活之步驟。在一些實施例中，病毒失活之步驟包括將清潔劑添加至不純製劑中。在一些實施例中，本發明之發明性方法進一步包括在最後一個層析管柱之後病毒去除之步驟。在一些實施例中，本發明方法進一步包括超濾及/或滲濾之步驟。在一些實施例中，超濾及/或滲濾之步驟包括將純化重組I2S蛋白質交換至藥物調配物緩衝液中。

在一些實施例中，本發明係用於純化具有與SEQ ID NO:1具有至少約50% (例如，至少約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)一致性之胺基酸序列之重組I2S蛋白質。在一些實施例中，本發明係用於純化胺基酸序列與SEQ ID NO:1一致之重組I2S蛋白質。

在一些實施例中，本發明係用於純化由於無血清培養基中之懸浮液中培養之哺乳動物細胞產生的重組I2S蛋白質。在一些實施例中，基適用於本發明之無血清培養缺少動物源性組份。在一些實施例中，適用於本發明之無血清培養基為化學配方培養基。在一些實施例中，哺乳動物細胞係於生物反應器中培養。在一些實施例中，哺乳動物細胞共同表現重組I2S蛋白質及甲醯甘胺酸生成酶(FGE)。在一些實施例中，哺乳動物細胞為人類細胞。

在一些實施例中，用於本發明方法中之不純製劑係自含有自哺乳動物細胞分泌之重組I2S蛋白質之無血清培養基製備。在一些實施例中，用於本發明方法中之不純製劑係自冷凍培養基製劑解凍。

在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質平均含有每分子16個至22個(例如，16個至21個、16個至20個、16個至19個、17個至22個、17個至21個、17個至20個、17個至19個)唾液酸。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質平均含有每分子16個、17個、18個、19個、20個、21個或22個唾液酸。

在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質具有與人類I2S (SEQ ID NO:1)之Cys59相對應之半胱胺酸殘基至C α -甲醯甘胺酸 (FGly)之至少約70% (例如，至少約77%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)轉化。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質具有與人類I2S (SEQ ID NO:1)之Cys59相對應之半胱胺酸殘基至C α -甲醯甘胺酸 (FGly)之實質上100%轉化。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質具有至少20 U/mg、30 U/mg、40 U/mg、50 U/mg、60 U/mg、70 U/mg、80 U/mg、90 U/mg或100 U/mg之特異性活性，如藉由使用肝素雙糖作為受質之活體外硫酸根釋放活性分析所測定。

在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質係以大於70%、75%、80%、85%、90%、95%之細胞攝取為特徵，如藉由活體外攝取分析所測定。

在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質係以聚糖圖譜為特徵，該聚糖圖譜包含7個分別指示中性(峰群組1)、經單唾液酸化(峰群組2)、經二唾液酸化(峰群組3)、經單磷酸化(峰群組4)、經三唾液酸化(峰群組5)、經四唾液酸化(峰群組6)及經二磷酸化(峰群組7)之I2S蛋白質之峰群組。在一些實施例中，在神經胺酸酶消化後生成聚糖圖譜。在其他實施例中，在鹼性磷酸酶消化後生成聚糖圖譜。

本發明尤其提供如上文所闡述之經純化重組I2S蛋白質及含其之醫藥組合物或調配物。在一些實施例中，調配物係經調配用於靜脈內、皮下及/或鞘內投與。本發明亦提供藉由將純化重組I2S、含其之醫藥組合物或調配物投與需要治療之受試者來治療韓特氏症候群之方法。

除非另外具體指示，否則本文所使用之術語「I2S蛋白質」、

「I2S」、「I2S酶」或語法等效物係指重組I2S蛋白質分子之製劑。

本申請案中所使用之術語「約」及「大約」可作為等效物使用。本申請案中與或不與約/大約一起使用之任何數字意欲涵蓋熟習此項技術者所瞭解之任何正常波動。

本發明之其他特性、目的及優勢在以下詳細說明中顯而易見。然而，應瞭解，該詳細說明雖然指示本發明之實施例，但僅以闡釋而非限制之方式給出。根據該詳細說明，本發明範圍內之各種變化及修改對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

下文所闡述之各圖一起構成圖式，其僅係出於圖解說明目的，而非用於限制。

圖1繪示於無血清培養基中產生之重組I2S之實例性純化方案。

圖2繪示經純化重組I2S AF與參照I2S相比之實例性肽圖譜。

圖3繪示經純化重組I2S AF之實例性SDS-PAGE (銀)分析。

圖4繪示藉由離子交換層析法評估之經純化重組I2S AF之實例性電荷剖面分析。

圖5繪示經純化重組I2S AF之實例性聚糖圖譜剖面。

圖6繪示重組I2S之澄清收穫物在病毒失活UPB步驟後之活性(U/mg)之實例性分析。

圖7繪示重組I2S之澄清收穫物在病毒失活UPB步驟後之SEC-HPLC之實例性分析。

圖8繪示利用經純化重組I2S蛋白質之銀染色劑處理之實例性SDS-PAGE。

圖9顯示自在無血清培養條件下生長之I2S-AF 2D細胞系產生之經純化重組I2S酶(上圖)與參照相比之實例性肽圖譜。

圖10繪示針對使用在無血清細胞培養條件下生長之I2S-AF 2D及S

4D細胞系產生之經純化重組I2S酶所生成與參照相比之實例性聚糖剖面。

圖11繪示針對使用在無血清細胞培養條件下生長之I2S-AF 2D細胞系產生之經純化重組I2S酶所生成與I2S參照對照相比之實例性電荷剖面。

定義

為更容易地理解本發明，下文首先定義某些術語。以下術語及其他術語之其他定義係闡釋於本說明書通篇中。

大約或約：本文所使用之應用於一或多個所關注值之術語「大約」或「約」係指與所述參照值類似之值。在某些實施例中，除非上下文中另有說明或其他證據，否則術語「大約」或「約」係指一系列在所述參照值在任一方向上(大於或小於)之25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小內之值(其中該數字將超過可能值之100%除外)。

生物活性：本文所使用之片語「生物活性」係指在生物系統(例如細胞培養物、生物體等)中具有活性之任一物質之特徵。例如，在投與生物體時對該生物體具有生物效應之物質視為具有生物活性。亦可藉由活體外分析(例如，活體外酶分析，例如硫酸根釋放分析)來測定生物活性。在特定實施例中，若蛋白質或多肽具有生物活性，則該蛋白質或多肽中共享蛋白質或多肽之至少一種生物活性的部分通常稱為「生物活性」部分。在一些實施例中，蛋白質係自細胞培養系統產生及/或純化，其在投與受試者時展示生物活性。在一些實施例中，蛋白質要求進一步處理以變得具有生物活性。在一些實施例中，蛋白質需要轉譯後修飾，例如(但不限於)糖基化(例如，唾液酸基化)、法呢基化、裂解、摺疊、甲醯甘胺酸轉化及其組合，以變得具有生物活

性。在一些實施例中，以前形式(即不成熟形式)產生之蛋白質可要求其他修飾，以變得具有生物活性。

非陽離子依賴性甘露醇-6-磷酸鹽受體(CI-MPR)：本文所使用之術語「非陽離子依賴性甘露醇-6-磷酸鹽受體(CI-MPR)」係指結合高基氏體(Golgi apparatus)中肯定會轉運至溶酶體之酸性水解酶前體上之甘露醇-6-磷酸鹽(M6P)標籤的細胞受體。除甘露醇-6-磷酸鹽以外，CI-MPR亦結合其他蛋白質(包括IGF-II)。CI-MPR亦稱為「M6P/IGF-II受體」、「CI-MPR/IGF-II受體」、「IGF-II受體」或「IGF2受體」。該等術語及其縮寫在本文中可互換使用。

層析法：本文所使用之術語「層析法」係指混合物之分離技術。通常，將混合物溶解於稱為「流動相」之流體中，該流體攜帶其穿過固持另一稱為「固定相」之材料之結構。管柱層析法係其中固定床係在管(即管柱)內之分離技術。

稀釋劑：本文所使用之術語「稀釋劑」係指可用於製備重構調配物之醫藥上可接受(例如，對於投與人類安全且無毒)之稀釋物質。實例性稀釋劑包括 無菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)、無菌鹽水溶液、林格式溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。

溶析：本文所使用之術語「溶析」係指藉由利用溶劑洗滌來將一種材料自另一種材料萃取之製程。例如，在離子交換層析法中，溶析係洗滌所裝載之樹脂以去除所捕獲之離子的製程。

析出液：本文所使用之術語「析出液」係指流動相「載體」與自層析法排出、通常作為溶析之結果之分析物材料的組合。

酶替代療法(ERT)：本文所使用之術語「酶替代療法(ERT)」係指藉由提供缺失酶來校正酶缺陷之任何治療策略。在投與時，酶係由細胞吸收並轉運至溶酶體，在溶酶體中該酶起作用以消除因酶缺陷而累

積於溶酶體中之材料。通常，對於有效之溶酶體酶替代療法，將治療酶遞送至貯積缺陷明顯之標靶組織中之適當細胞中的溶酶體。

使平衡或平衡：本文所使用之與層析法相關之術語「使...平衡」或「平衡」係指使第一液體(例如，緩衝液)與另一液體達到平衡、通常以達成該液體(例如，緩衝液)之組份之穩定且均等分佈之製程。例如，在一些實施例中，可藉由使一或多個管柱體積之期望液體(例如，緩衝液)穿過管柱來使層析管柱平衡。

改良、增加或降低：本文所使用之術語「改良」、「增加」或「降低」或語法等效物表示相對於基線量測(例如相同個體在開始本文所闡述治療前之量測或對照個體(或多個對照個體)在不存在本文所闡述治療情況下之量測)之值。「對照個體」係患有與所治療個體相同之溶酶體貯積病形式之個體，其與所治療個體之年齡大致相同(以確保所治療個體與對照個體之疾病階段相當)。

雜質：本文所使用之術語「雜質」係指有限量之液體、氣體或固體內之物質，其與標靶材料或化合物之化學組成不同。雜質亦稱為污染物。

連接體：本文所使用之術語「連接體」係指融合蛋白中不在天然蛋白質中特定位置出現且通常經設計以具有撓性或將結構(例如 α -螺旋)插入兩個蛋白質部分之間的胺基酸序列。連接體亦稱為間隔基因。

裝載：本文所使用之術語「裝載」係指在層析法中將含有樣品之液體或固體添加至管柱中。在一些實施例中，然後在所裝載樣品穿過管柱時，捕獲裝載至管柱上之樣品之特定組份。在一些實施例中，在所裝載樣品穿過管柱時，裝載至管柱上之樣品之特定組份未由管柱捕獲或「流動穿過」管柱。

多肽：一般而言，本文所使用之「多肽」係至少兩個藉由肽鍵

彼此附接之胺基酸之串。在一些實施例中，多肽可包括至少3個至5個胺基酸，每一胺基酸藉助至少一個肽鍵附接至其他胺基酸。熟習此項技術者應瞭解，多肽有時視情況包括「非天然」胺基酸或仍然能整合至多肽鏈中之其他實體。

庫：本文所使用之與層析法相關之術語「庫」係指組合一或多個一起穿過管柱之流體流分。例如，在一些實施例中，可將一或多個含有樣品中已藉由層析法分離之期望組份之流分(例如，「峰流分」)「彙集」在一起以生成單一「彙集」流分。

替代酶：本文所使用之術語「替代酶」係指可起作用以至少部分替代欲治療疾病中之缺陷或缺失酶的任何酶。在一些實施例中，術語「替代酶」係指可起作用以至少部分替代欲治療溶酶體貯積病中之缺陷或缺失溶酶體酶的任何酶。在一些實施例中，替代酶能夠減少哺乳動物溶酶體中所累積之材料或其可挽救或改善一或多個溶酶體貯積病症狀。適用於本發明之替代酶包括野生型或經修飾溶酶體酶，且可使用重組及合成方法產生或自天然來源純化。替代酶可係重組、合成、經基因活化或天然酶。

可溶的：本文所使用之術語「可溶的」係指治療劑能夠形成均質溶液。在一些實施例中，治療劑於溶液中之溶解性足以容許將治療有效量之治療劑遞送至目標作用位點，其中將治療劑投與該溶液中並藉由該溶液轉運至目標作用位點。數個因素可影響治療劑之溶解性。例如，可影響蛋白質溶解性之有關因素包括離子強度、胺基酸序列及存在其他輔助增溶劑(co-solubilizing agent)或鹽(例如，鈣鹽)。在一些實施例中，本發明治療劑可溶於其對應醫藥組合物中。

穩定性：本文所使用之術語「穩定的」係指治療劑(例如，重組酶)能夠在長時間內保持其治療效力(例如，其預期生物活性及/或生理化學完整性之全部或大部分)。可在長時間內(例如，持續至少1個§

月、3個月、6個月、12個月、18個月、24個月、30個月、36個月或更長時間)評估治療劑之穩定性及醫藥組合物保持該治療劑之穩定性的能力。在調配物之上下文中，穩定調配物係其中之治療劑在儲存後及在各製程(例如冷凍/解凍、機械混合及凍乾)期間基本上保留其物理及/或化學完整性及生物活性者。對於蛋白質穩定性而言，其可藉由高分子量(HMW)聚集體之形成、酵素活性之損失、肽片段之生成及電荷分佈之移位來量測。

病毒處理：本文所使用之術語「病毒處理」係指其中僅自樣品去除病毒之「病毒去除」或其中病毒保持於樣品中但呈非感染形式之「病毒失活」。在一些實施例中，病毒去除尤其可利用奈米過濾及/或層析技術。在一些實施例中，病毒失活尤其可利用溶劑失活、清潔劑失活、巴氏殺菌法(pasteurization)、酸性pH失活及/或紫外線失活。

【實施方式】

本發明尤其提供用於基於涉及少於6個層析步驟之製程純化重組I2S蛋白質用於酶替代療法之改良方法。在一些實施例中，本發明提供使用基於陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析法中之一或多者之製程自不純製劑純化重組I2S蛋白質之方法。在一些實施例中，本發明提供藉由實施Q層析法、羥磷灰石(HA)層析法、SP層析法及苯基層析法自不純製劑純化重組I2S蛋白質之方法。本發明進一步提供經純化重組I2S蛋白質及使用方法。

在以下分段中進一步詳細闡述本發明之各個態樣。使用各分段並不意欲限制本發明。每一分段可適用於本發明之任何態樣。在此申請案中，除非另有說明，否則使用「或」意指「及/或」。

重組I2S蛋白質

如本文中所使用，I2S蛋白質係可取代天然存在之艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)蛋白質之至少一部分活性或挽救一或多個與I2S-缺陷

相關之表現型或症狀的任何蛋白質或蛋白質之一部分。本文所使用之術語「I2S酶」及「I2S蛋白質」及語法等效物可互換使用。

通常，人類I2S蛋白質係以前體形式產生。人類I2S之前體形式含有信號肽(全長前體之胺基酸殘基1-25)、前肽(全長前體之胺基酸殘基26-33)及可進一步處理成42 kDa鏈(全長前體之殘基34-455)及14 kDa鏈(全長前體之殘基446-550)的鏈(全長前體之殘基34-550)。通常，該前體形式亦稱為全長前體或全長I2S蛋白質，其含有550個胺基酸。典型野生型或天然存在之人類I2S蛋白質之信號肽經移除之成熟形式(SEQ ID NO:1)以及全長前體(SEQ ID NO:2)的胺基酸序列係顯示於表1中。信號肽經加下劃線。另外，人類I2S蛋白質同種型a及b前體之胺基酸序列亦提供於表1中，分別為SEQ ID NO:3及4。

表1. 人類艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶

成熟形式	SETQANSTTDALNVLLIIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFPLANFSDIHAGELYFVDSDDLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:1)
全長前體 (同種型a)	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFPLANFSDIHAGELYFVDSDDLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:2)

同種型b前體	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFN SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQEDQSSTGFRLKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
同種型c前體	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFN SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL DDLQLANSTIIAFTSDHGLMRTNT (SEQ ID No:4)

因此，在一些實施例中，重組I2S蛋白質係成熟人類I2S蛋白質 (SEQ ID NO:1)。如上文所揭示，SEQ ID NO:1代表人類I2S蛋白質之標準胺基酸序列。在一些實施例中，I2S蛋白質可係SEQ ID NO:1之剪接同種型及/或變體，其係由I2S基因之5' UTR內之替代性起始位點處之轉錄產生。在一些實施例中，重組I2S蛋白質可係成熟人類I2S蛋白質之同系物或類似物。例如，成熟人類I2S蛋白質之同系物或類似物可係與野生型或天然存在之I2S蛋白質(例如，SEQ ID NO:1)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入同時保留實質I2S蛋白質活性之經修飾成熟人類I2S蛋白質。因此，在一些實施例中，重組I2S蛋白質與成熟人類I2S蛋白質(SEQ ID NO:1)實質上同源。在一些實施例中，重組I2S蛋白質之胺基酸序列與SEQ ID NO:1具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源性。在一些實施例中，重組I2S蛋白質與成熟人類I2S蛋白質(SEQ ID NO:1)實質上一致。在一些實施例中，重組I2S蛋白質具有與SEQ ID NO:1具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有成熟人類I2S蛋白質

之片段或部分。

另一選擇為，重組I2S蛋白質係全長I2S蛋白質。在一些實施例中，重組I2S蛋白質可係全長人類I2S蛋白質之同系物或類似物。例如，全長人類I2S蛋白質之同系物或類似物可係與野生型或天然存在之全長I2S蛋白質(例如，SEQ ID NO:2)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入同時保留實質I2S蛋白質活性之經修飾全長人類I2S蛋白質。因此，在一些實施例中，重組I2S蛋白質與全長人類I2S蛋白質(SEQ ID NO:2)實質上同源。例如，重組I2S蛋白質之胺基酸序列可與SEQ ID NO:2具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源性。在一些實施例中，重組I2S蛋白質與SEQ ID NO:2實質上一致。例如，重組I2S蛋白質可具有與SEQ ID NO:2具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有全長人類I2S蛋白質之片段或部分。如本文所使用，全長I2S蛋白質通常含有信號肽序列。

在一些實施例中，重組I2S蛋白質係人類I2S同種型a蛋白質。在一些實施例中，重組I2S蛋白質可係人類I2S同種型a蛋白質之同系物或類似物。例如，人類I2S同種型a蛋白質之同系物或類似物可係與野生型或天然存在之人類I2S同種型a蛋白質(例如，SEQ ID NO:3)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入同時保留實質I2S蛋白質活性之經修飾人類I2S同種型a蛋白質。因此，在一些實施例中，重組I2S蛋白質與人類I2S同種型a蛋白質(SEQ ID NO:3)實質上同源。例如，重組I2S蛋白質之胺基酸序列可與SEQ ID NO:3具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有全長人類I2S同種型a蛋白質之片段或部分。如本文所使用，全長I2S同種型a蛋白質通常含有信號肽序列。

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源性。在一些實施例中，重組I2S蛋白質與SEQ ID NO:3實質上一致。例如，重組I2S蛋白質可具有與SEQ ID NO:3具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有人類I2S同種型a蛋白質之片段或部分。如本文所使用，人類I2S同種型a蛋白質通常含有信號肽序列。

在一些實施例中，重組I2S蛋白質係人類I2S同種型b蛋白質。在一些實施例中，重組I2S蛋白質可係人類I2S同種型b蛋白質之同系物或類似物。例如，人類I2S同種型b蛋白質之同系物或類似物可係與野生型或天然存在之人類I2S同種型b蛋白質(例如，SEQ ID NO:4)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入同時保留實質I2S蛋白質活性之經修飾人類I2S同種型b蛋白質。因此，在一些實施例中，重組I2S蛋白質與人類I2S同種型b蛋白質(SEQ ID NO:4)實質上同源。例如，重組I2S蛋白質之胺基酸序列可與SEQ ID NO:4具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源性。在一些實施例中，重組I2S蛋白質與SEQ ID NO:4實質上一致。例如，重組I2S蛋白質可具有與SEQ ID NO:4具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有人類I2S同種型b蛋白質之片段或部分。如本文所使用，人類I2S同種型b蛋白質通常含有信號肽序列。

人類I2S蛋白質之同系物或類似物可根據熟習此項技術者所已知用於改變多肽序列之方法製備，例如參見概述該等方法之參照文獻。在一些實施例中，胺基酸之保守取代包括以下群組內之胺基酸間進行

之取代：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；及(g) E、D。在一些實施例中，「保守胺基酸取代」係指不改變進行胺基酸取代之蛋白質之有關電荷或大小特徵的胺基酸取代。

在一些實施例中，重組I2S蛋白質可含有與標靶細胞表面上之受體結合以促進細胞攝取及/或溶酶體靶向之部分。例如，此一受體可係結合甘露醇-6-磷酸鹽(M6P)殘基之非陽離子依賴性甘露醇-6-磷酸鹽受體(CI-MPR)。另外，CI-MPR亦結合其他蛋白質(包括IGF-II)。在一些實施例中，重組I2S蛋白質含有蛋白質表面上之M6P殘基。特定而言，重組I2S蛋白質可含有對CI-MPR具有較高結合親和力之雙磷酸化寡糖。在一些實施例中，適宜酶含有至多大約平均每個酶約至少20%雙磷酸化寡糖。在其他實施例中，適宜酶可含有每個酶約10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%雙磷酸化寡糖。

在一些實施例中，重組I2S酶可與能夠與標靶細胞表面上之受體結合之溶酶體靶向部分融合。適宜溶酶體靶向部分可係IGF-I、IGF-II、RAP、p97及其變體、同系物或片段(例如，包括具有與野生型成熟人類IGF-I、IGF-II、RAP、p97肽序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%一致性之序列之彼等肽)。溶酶體靶向部分可於N端、C端或內部與I2S蛋白質或酶偶聯或融合。

重組I2S蛋白質之產生

本發明可用於純化藉由各種方式產生之重組I2S蛋白質。例如，可藉由利用經改造以表現編碼I2S之核酸的宿主細胞系統來重組產生I2S蛋白質。另一選擇為，可藉由活化內源性I2S基因來產生I2S蛋白質。

預期本發明可用於純化使用各種表現系統產生之重組I2S蛋白質。

質。適宜表現系統包括(例如)卵、桿狀病毒、植物、酵母菌或哺乳動物細胞。

在一些實施例中，I2S酶係產生於哺乳動物細胞中。可根據本發明使用之哺乳動物細胞之非限制性實例包括BALB/c小鼠骨髓瘤細胞系(NSO/1，ECACC編號：85110503)；人類視網膜胚細胞(PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands)；由SV40轉型之猴腎CV1細胞系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胎腎細胞系(經亞選殖以在懸浮培養物中生長之HEK293或293細胞，Graham等人，J. Gen Virol., 36:59,1977)；人類纖維肉瘤細胞系(例如，HT1080)；幼倉鼠腎細胞(BHK21, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞 +/-DHFR (CHO，Urlaub及Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980)；小鼠賽特利氏(sertoli)細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1 587)；人類宮頸癌細胞(HeLa, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982)；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝癌細胞系(Hep G2)。

在一些實施例中，本發明之發明性方法係用於純化自人類細胞例如，HT1080)產生之重組I2S酶。在一些實施例中，本發明之發明性方法係用於純化自CHO細胞產生之重組I2S酶。

通常，經改造以表現重組I2S之細胞可包含編碼本文中所闡述之重組I2S蛋白質之轉基因。應瞭解，編碼重組I2S之核酸可含有調控序列、基因控制序列、啟動子、非編碼序列及/或用於表現重組I2S之其他適當序列。通常，編碼區係與該等核酸組份中之一或多者以操作方

式連接。

「調控序列」通常係指位於編碼序列之上游(5'非編碼序列)、內部或下游(3'非編碼序列)且影響相關編碼序列之轉錄、RNA處理或穩定性或轉譯的核苷酸序列。調控序列可包括啓動子、轉譯前導序列、內含子及聚腺苷酸化識別序列。有時，「調控序列」亦稱為「基因控制序列」。

「啓動子」通常係指能夠控制編碼序列或功能性RNA之表現的核苷酸序列。一般而言，編碼序列係位於啓動子序列之3'。啓動子序列係由近側及更遠側上游元件組成，後一元件經常稱為增強子。因此，「增強子」係可刺激啓動子活性之核苷酸序列且可係啓動子之先天元件或經插入以增強啓動子之層次或組織特異性之異源元件。啓動子可整體源於天然基因，或由源於自然界中所發現之不同啓動子之不同元件組成，或甚至包含合成核苷酸區段。熟習此項技術者應理解，不同啓動子可引導基因於不同組織或細胞類型中或於不同發育階段時或因應不同環境條件而表現。

「3'非編碼序列」通常係指位於編碼序列下游之核苷酸序列，且包括聚腺苷酸化識別序列及編碼能夠影響mRNA處理或基因表現之調控信號之其他序列。聚腺苷酸化信號之特徵通常為影響聚腺苷酸序列添加至mRNA前體之3'端。

「轉譯前導序列」或「5'非編碼序列」通常係指位於基因之啓動子序列與編碼序列之間之核苷酸序列。轉譯前導序列係存在於轉譯起始序列之全處理mRNA上游。轉譯前導序列可影響初級轉錄物至mRNA之處理過程、mRNA穩定性或轉譯效率。

通常，術語「以操作方式連接」(「operatively linked」或「operably linked」)係指兩個或更多個核酸片段於單一核酸片段上結合以使得一者之功能受另一者的影響。例如，當啓動子能夠影響編碼

序列之表現(即編碼序列係處於啓動子之轉錄控制下)時，該啓動子係與該編碼序列以操作方式連接。編碼序列可與調控序列以同義或反義定向以操作方式連接。

轉基因之編碼區可包括一或多個沉默突變以針對特定細胞類型使密碼子使用最佳化。例如，I2S轉基因之密碼子可針對於脊椎動物細胞中之表現最佳化。在一些實施例中，I2S轉基因之密碼子可針對於哺乳動物細胞中之表現最佳化。在一些實施例中，I2S轉基因之密碼子可針對於人類細胞中之表現最佳化。

視情況，構築體可含有其他組份，例如以下中之一或多者：剪接位點、增強子序列、處於適當啓動子之控制下之可選擇標記基因、處於適當啓動子之控制下之可擴增標記基因及基質結合區(matrix attachment region, MAR)或業內已知增強其所插入區之表現之其他元件。

在轉染或轉導至宿主細胞中時，可於染色體外(以游離基因方式)表現適宜載體或將其整合至宿主細胞之基因組中。

重組I2S蛋白質之活化

通常，藉由將保守半胱胺酸(與成熟人類I2S之胺基酸59相對應)轉譯後修飾成甲醯甘胺酸(亦稱為2-胺基-3-側氧基丙酸或側氧基丙胺酸)來活化重組I2S酶。可藉由稱為甲醯甘胺酸生成酶(FGE)之酶實施該轉譯後修飾。因此，在一些實施例中，重組I2S酶係於亦表現FGE蛋白質之細胞中產生。在特定實施例中，重組I2S酶係於具有增加或增強之FGE蛋白質表現之細胞中產生。例如，細胞可經改造以過度表現FGE與重組I2S之組合，從而促進具有高含量活性酶之I2S製劑之產生。在一些實施例中，FGE之過度表現係藉由使用標準重組技術表現(例如，過度表現)外源性FGE來達成。在一些實施例中，FGE之過度表現係藉由(例如)活化或增強內源性FGE基因之啓動子以活化或增強

內源性FGE之表現來達成。在一些情形下，編碼重組I2S之核酸及編碼重組FGE蛋白質之核酸係藉由具有與內部核糖體進入位點相對應之序列之核酸(例如，間隔序列)連接。

具有將半胱胺酸轉化成甲醯甘胺酸之能力之任何FGE可用於本發明中。FGE蛋白質之實例性核酸及胺基酸序列係揭示於US 2004-0229250中，與該等序列有關之整個內容及序列本身以引用的方式整體併入本文中。應瞭解，編碼重組FGE之核酸可包含調控序列、基因控制序列、啟動子、非編碼序列及/或用於表現FGE之其他適當序列。通常，編碼區係與該等核酸組份中之一或多者以操作方式連接。

細胞培養基及條件

可使用各種細胞培養基及條件產生重組I2S蛋白質。例如，可於含有血清或無血清培養基中產生重組I2S蛋白質。在一些實施例中，於無血清培養基中產生重組I2S蛋白質。在一些實施例中，於無動物源性培養基(animal free medium，即缺少動物源性組份之培養基)中產生重組I2S蛋白質。在一些實施例中，於化學配方培養基中產生重組I2S蛋白質。本文所使用之術語「化學配方營養培養基」係指實質上所有化學組份為已知的培養基。在一些實施例中，化學配方營養培養基不含諸如血清、血清源蛋白質(例如，白蛋白或胎球蛋白)等動物源性組份及其他組份。在一些情形下，化學配方培養基包含一或多種蛋白質(例如，蛋白質生長因子或細胞因子)。在一些情形下，化學配方營養培養基包含一或多種蛋白質水解產物。在其他情形下，化學配方營養培養基係無蛋白質培養基，即不含未知組成之蛋白質、水解產物或組份之無血清培養基。

在一些實施例中，化學配方培養基可補充有一或多種動物源性組份。該等動物源性組份包括(但不限於)胎牛血清、馬血清、山羊血清、驢血清、人類血清及血清源蛋白質，例如白蛋白(例如，牛血清

白蛋白或人類血清白蛋白)。

可使用各種細胞培養條件大規模產生重組I2S蛋白質，包括(但不限於)滾瓶培養、生物反應器分批培養及生物反應器饋料分批培養。在一些實施例中，藉由懸浮培養之細胞產生重組I2S蛋白質。在一些實施例中，藉由附著細胞產生重組I2S蛋白質。

實例性細胞培養基及培養條件係闡述於實例部分中。用於產生重組I2S蛋白質之其他實例性方法及組合物係闡述與其於同一日期申請之標題為「Methods and Compositions for Producing Recombinant Iduronate-2-Sulfatase」之臨時申請案中，其整個揭示內容以引用的方式併入本文中。

重組I2S蛋白質之純化

在一些實施例中，本發明提供使用基於陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析法中之一或多者之製程自不純製劑純化重組I2S蛋白質之方法。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及少於6個(例如，少於5個、少於4個或少於3個)層析步驟。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及2個、3個、4個或5個層析步驟。在一些實施例中，本發明之發明性方法涉及4個層析步驟。在一些實施例中，本發明之發明性方法係以陰離子交換層析法、混合模式層析法、陽離子交換層析法及疏水作用層析法之順序實施。

不純製劑

如本文中所使用，不純製劑可係任何生物材料，包括含有重組I2S蛋白質之未經處理生物材料。例如，不純製劑可係含有自產生I2S蛋白質之細胞(例如，哺乳動物細胞)分泌之重組I2S蛋白質的未經處理細胞培養基或含有I2S蛋白質之原始細胞溶解物。在一些實施例中，不純製劑可係經部分處理之細胞培養基或細胞溶解物。例如，可將細

胞培養基或細胞溶解物濃縮，稀釋，利用病毒失活、病毒處理或病毒去除處理。在一些實施例中，病毒去除尤其可利用奈米過濾及/或層析技術。在一些實施例中，病毒失活尤其可利用溶劑失活、清潔劑失活、巴氏殺菌法、酸性pH失活及/或紫外線失活。亦可利用蛋白酶、DNase及/或RNase處理細胞培養基或細胞溶解物，以減少宿主細胞蛋白及/或核酸(例如，DNA或RNA)之含量。在一些實施例中，可將未經處理或經部分處理之生物材料(例如，細胞培養基或細胞溶解物)冷凍，並存儲於期望溫度(例如，2°C至8°C、-4°C、-25°C、-75°C)下一段時間，且然後解凍用於純化。如本文中所使用，不純製劑亦稱為起始材料或裝載材料。

陰離子交換層析法

在一些實施例中，所提供之用於純化重組I2S之方法包括陰離子交換層析法。簡言之，陰離子交換層析法係依賴於帶負電荷之化合物與帶正電荷之樹脂之間之電荷-電荷相互作用之層析技術。在一些實施例中，陰離子交換層析法係強陰離子交換層析法。在一些實施例中，採用陰離子交換層析法作為治療蛋白質(例如，重組I2S)之第一純化步驟。

實例性陰離子交換樹脂包括(但不限於)三級胺樹脂或「Q-樹脂」(例如，Capto™-Q、Q-Sepharose®、QAE Sephadex®)；二乙基胺基乙烷(DEAE)樹脂(例如，DEAE-Trisacryl®、DEAE瓊脂糖®、苯甲醯基化之羧基化之DEAE、二乙基胺基乙基Sephacel®)；Amberjet®樹脂；Amberlyst®樹脂；Amberlite®樹脂(例如，Amberlite® IRA-67、Amberlite®強鹼性、Amberlite®弱鹼性)、考來烯胺(cholestyramine)樹脂、ProPac®樹脂(例如，ProPac® SAX-10、ProPac® WAX-10、ProPac® WCX-10)；TSK-GEL®樹脂(例如，TSKgel DEAE-NPR；TSKgel DEAE-5PW)；及Acclaim®樹脂。在某些實施例中，陰離子交換樹脂

係Q樹脂。

陰離子交換層析法之典型流動相包括相對極性溶液，例如水、乙腈、諸如甲醇、乙醇及異丙醇等有機醇或含有2-(N-嗎啉基)-乙烷磺酸(MES)之溶液。因此，在某些實施例中，流動相包括約0%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或約100%極性溶液。在某些實施例中，在分離過程期間之任一給定時間流動相包含介於約1%至約100%、約5%至約95%、約10%至約90%、約20%至約80%、約30%至約70%或約40%至約60%極性溶液。

一般而言，流動相包括鹽。例如，鹽(例如，氯化鈉)可自陰離子交換管柱溶析結合蛋白(例如，抗衡離子為氯，且其交換為標靶蛋白，然後釋放標靶蛋白)。在一些實施例中，流動相包括介於約0 M至約1.0 M之間、例如介於約0 M至約0.8 M之間、介於約0 M至約0.6 M之間、介於約0 M至約0.5 M之間、介於約0 M至約0.4 M之間、介於約0.05 M至約0.50 M之間、介於約0.10 M至約0.45 M之間、介於約0.10 M至約0.40 M之間或介於約0.15 M至約0.40 M之間之鹽濃度。在一些實施例中，流動相包括大約0.01 M、0.02 M、0.03 M、0.04 M、0.05 M、0.06 M、0.07 M、0.08 M、0.09 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M、0.5 M、0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M或1.0 M之鹽濃度。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度為梯度的(例如，線性或非線性梯度)。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度為恆定的。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度可逐步增加或降低。

通常，流動相係經緩衝。在某些實施例中，流動相係未經緩衝。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約14之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約10之間之pH。在某

些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約7之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至約6.5之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至約5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10之pH。

在一些實施例中，在裝載至陰離子交換層析管柱(例如，Q管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之pH調整至約5.0、5.5、6.0、6.5、7.0或7.5且將導電率調整至約2 mS/cm、4 mS/cm、6 mS/cm、8 mS/cm、10 mS/cm、12 mS/cm、14 mS/cm、16 mS/cm、18 mS/cm或20 mS/cm。可使用乙酸鈉(例如，1M)調整pH，且可使用氯化鈉(例如，5M)調整導電率。在裝載時，可使用包含濃度在約140 mM至約200 mM範圍內(例如，約140 mM、145 mM、150 mM、155 mM、160 mM、165 mM、170 mM、175 mM、180 mM、185 mM、190 mM、195 mM或200 mM)之鹽(例如，NaCl)且pH為約5.0至7.5(例如，約5.0、5.5、6.0、6.5、7.0或7.5)之洗滌緩衝液洗滌陰離子交換層析管柱。可使用包含線性NaCl梯度之溶析緩衝液溶析陰離子交換層析管柱。適宜實例性線性NaCl梯度可含有約0 mM至500 mM NaCl(例如，約0 mM至400 mM、約0 mM至350 mM、約0 mM至300 mM、約50 mM至500 mM、約150 mM至500 mM、約150 mM至450 mM、約150 mM至400 mM)之範圍。

陽離子交換層析法

在一些實施例中，所提供之用於純化重組I2S之方法包括陽離子交換層析法。簡言之，陽離子交換層析法係依賴於帶正電荷之化合物與帶負電荷之樹脂之間之電荷-電荷相互作用之層析技術。在一些實施例中，陽離子交換層析法係強陽離子交換層析法。

通常利用強或弱陽離子交換管柱(含有銻離子)或利用弱陽離子交換劑(通常具有羧甲基(CM)或羧酸鹽(CX)官能團)實踐陽離子交換層析法。

法。許多適宜陽離子交換樹脂為業內已知且市面有售，且包括(但不限於) SP-Sepharose[®]、CM Sepharose[®]；Amberjet[®]樹脂；Amberlyst[®]樹脂；Amberlite[®]樹脂(例如，Amberlite[®] IRA120)；ProPac[®]樹脂(例如，ProPac[®] SCX-10、ProPac[®] WCX-10、ProPac[®] WCX-10)；TSK-GEL[®]樹脂(例如，TSKgel BioAssist S；TSKgel SP-2SW、TSKgel SP-5PW；TSKgel SP-NPR；TSKgel SCX；TSKgel SP-STAT；TSKgel CM-5PW；TSKgel OApak-A；TSKgel CM-2SW、TSKgel CM-3SW、and TSKgel CM-STAT)；及Acclaim[®]樹脂。在某些實施例中，陰離子交換樹脂為SP-瓊脂糖樹脂[®]。

陽離子交換層析法之典型流動相包括相對極性溶液，例如水、乙腈、諸如甲醇、乙醇及異丙醇等有機醇或含有2-(N-嗎啉基)-乙烷磺酸(MES)之溶液。因此，在某些實施例中，流動相包括約0%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或約100%極性溶液。在某些實施例中，在分離過程期間之任一給定時間流動相包括介於約1%至約100%、約5%至約95%、約10%至約90%、約20%至約80%、約30%至約70%或約40%至約60%極性溶液。

一般而言，流動相包括鹽。例如，鹽(例如，氯化鈉、磷酸鈉等)可自陽離子交換管柱溶析結合蛋白(例如，抗衡離子為鈉，且其交換為標靶蛋白，然後釋放標靶蛋白)。在一些實施例中，流動相包括介於約0 M至約1.0 M之間、例如介於約0 M至約0.8 M之間、介於約0 M至約0.6 M之間、介於約0 M至約0.5 M之間、介於約0 M至約0.4 M之間、介於約0.05 M至約0.50 M之間、介於約0.10 M至約0.45 M之間、介於約0.10 M至約0.40 M之間或介於約0.15 M至約0.40 M之間之鹽濃度。在一些實施例中，流動相包括大約0.01 M、0.02 M、0.03 M、

0.04 M、0.05 M、0.06 M、0.07 M、0.08 M、0.09 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M、0.5 M、0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M或1.0 M之鹽濃度。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度為梯度的(例如，線性或非線性梯度)。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度為恆定的。在一些實施例中，流動相中之鹽濃度可逐步增加或降低。

通常，流動相係經緩衝。在某些實施例中，流動相係未經緩衝。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約14之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約10之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約7之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至約6.5之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至約5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10之pH。

在一些實施例中，在裝載至陽離子交換層析管柱(例如，SP管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之導電率調整至介於約1 mS/cm與20 mS/cm之間(例如，介於約1 mS/cm與15 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與10 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與8 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與6 mS/cm之間、介於約1 mS/cm與4 mS/cm之間、介於約2 mS/cm與4 mS/cm之間)範圍內。在特定實施例中，在裝載至陽離子交換層析管柱(例如，SP管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之導電率調整至介於約2 mS/cm與4 mS/cm之間範圍內(例如，2 mS/cm、2.5 mS/cm、3 mS/cm、3.5 mS/cm或4 mS/cm)。可藉由以(例如) 1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2.0:1、2.5:1、3.0:1、4.0:1、5.0:1或10:1之比率利用H₂O稀釋不純製劑或中間析出液或流出物來調整導電率。亦可藉由滲濾至期望緩衝液中來調整導電率。在一些實施例中，在約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0或6.5)之pH下運行陽離子交換層析管柱。在一些實施例中，利用包含濃度在約0.01 M至

約0.1 M之範圍內(例如，約0.01 M、0.02 M、0.03 M、0.04 M、0.05 M、0.06 M、0.07 M、0.08 M、0.09 M或0.1 M)之磷酸鹽(例如， NaPO_4)之緩衝液運行陽離子交換層析管柱。在一些實施例中，適宜pH為約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0或6.5)。

混合模式層析法

羧磷灰石層析法(HA)係視為「偽親和力」層析法或「混合模式」離子交換，且可根據本發明使用。羧磷灰石係生物分子之分級分離及純化中所使用之獨特磷酸鈣形式。在一些情形下，可使用結晶羧磷灰石，但該等晶體之脆性可限制流速及/或管柱壽命。兩種類型之化學純陶瓷羧磷灰石(即CHT陶瓷羧磷灰石I型及II型)為大孔、球形的，且可在較高流速及壓力下使用。I型通常具有高蛋白質結合能力，而II型通常對蛋白質具有較低結合能力。一般而言，羧磷灰石之式為 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kawasaki等人1985)。官能團包括帶正電荷之晶體鈣離子對(C位點)及6個與晶體磷酸鹽三聯體結合之帶負電荷之氧原子之簇(P位點)。C位點、P位點及羧基係以固定型式分佈於晶體表面上，通常導致與蛋白質及其他分子之複雜相互作用。

可將樣品裝載至HA管柱上在中性pH下或附近之低離子強度磷酸鹽緩衝液(例如，1 mM至10 mM磷酸鈉或磷酸鉀)中。在一些實施例中，在裝載混合模式層析管柱(例如，HA管柱)之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之磷酸鹽(例如， NaPO_4)濃度調整至在約0.001 M至約0.01 M之範圍內(例如，約0.001 M、0.002 M、0.003 M、0.004 M、0.005 M、0.006 M、0.007 M、0.008 M、0.009 M或0.01 M)且將pH調整至約5.0至6.5 (例如，約5.0、5.5、6.0、或6.5)。通常利用具有與所裝載之緩衝液相當之磷酸鹽濃度之洗滌緩衝液洗滌所裝載之HA管柱。在一些實施例中，在裝載時，利用含有磷酸鹽(例如，1 mM至10 mM磷酸鈉或磷酸鉀)且在中性pH下或附近之洗滌緩衝液洗滌混合模

式層析管柱(例如，HA管柱)。例如，適宜洗滌緩衝液可具有約1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM或10 mM之磷酸鹽濃度。在一些實施例中，可期望增加洗滌緩衝液中磷酸鹽之量，以創建更嚴格之洗滌條件。預期I2S蛋白質表面之M6P含量、特定而言二-M6P含量對於溶酶體靶向而言甚為重要。洗滌緩衝液中增加之磷酸鹽濃度可選擇性保留HA管柱上具有高含量之M6P、特定而言二-M6P之I2S蛋白質。因此，在一些實施例中，期望洗滌緩衝液可具有為或高於10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM之磷酸鹽濃度。在一些實施例中，利用具有在約10 mM至20 mM (例如，約10 mM至18 mM、10 mM至16 mM、10 mM至15 mM、12 mM至20 mM、14 mM至18 mM、14 mM至16 mM)範圍內之磷酸鹽濃度之洗滌緩衝液洗滌所裝載之混合模式層析管柱(例如，HA管柱)。在一些實施例中，利用具有為或高於10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM之磷酸鹽濃度之洗滌緩衝液洗滌所裝載之混合模式層析管柱(例如，HA管柱)。

通常利用梯度磷酸鹽緩衝液達成自HA管柱之溶析。例如，適宜溶析緩衝液可具有大約1 mM至400 mM (例如，1 mM至300 mM、1 mM至200 mM、1 mM至150 mM、1 mM至100 mM、10 mM至350 mM、10 mM至300 mM、10 mM至250 mM、10 mM至200 mM、10 mM至150 mM、10 mM至140 mM、10 mM至130 mM、10 mM至120 mM、10 mM至110 mM、10 mM至100 mM、10 mM至90 mM、10 mM至80 mM、10 mM至70 mM、10 mM至60 mM、10 mM至50 mM)磷酸鈉之磷酸鹽梯度。在一些實施例中，藉由逐步提高溶析緩衝液中之磷酸鹽濃度來達成自HA管柱之溶析。在一些實施例中，逐步溶析緩衝液可具有選自10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、3

70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM之磷酸鹽濃度。在一些實施例中，藉由具有在約50 mM至約150 mM之範圍內(例如，選自約50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM及其組合之磷酸鹽(例如，磷酸鈉)濃度)之磷酸鹽(例如，磷酸鈉)濃度之溶析緩衝液達成自混合模式層析管柱(例如，HA管柱)之溶析。

應瞭解，HA層析法之許多不同條件組合為已知，且可用於調整參數以適用於所關注之特定蛋白質(例如，重組I2S)。

疏水作用層析法

疏水作用層析法(HIC)係使用疏水性將蛋白質彼此分離之分離技術。在此類型之層析法中，諸如苯基、辛基或丁基等疏水基團係附接至固定管柱。穿過管柱之在其表面具有疏水胺基酸側鏈之蛋白質能夠與管柱上之疏水基團相互作用並與其結合。HIC管柱為已知，且包括(例如)苯基瓊脂糖。

經常使用與離子交換層析法中所使用條件相反之條件設計HIC分離。一般而言，首先將具有高離子強度(通常硫酸銨)之緩衝液施加至管柱。緩衝液中之鹽降低樣品溶質之溶劑合作用，從而當溶劑合作用降低時，變得暴露之疏水區經培養基吸附。固定相通常經設計以與其他分子產生疏水作用。該等相互作用在水中通常太弱，然而，將鹽(例如， Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 、 NH_4Cl 、 NaBr 及 NaSCN)添加至緩衝液中導致疏水作用。在一些實施例中，流動相包括介於約0.1 M至約3.0 M之間(例如，介於約0.1 M至約1.5 M之間、介於約0.2 M至約0.8 M之間或介於約0.3 M至約0.5 M之間)之鹽濃度。

在某些實施例中，流動相係經緩衝。在某些實施例中，流動相係未經緩衝。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約14之

間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約10之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至介於約5至約7之間之pH。在某些實施例中，流動相係經緩衝至約5.0之pH。

在一些實施例中，在裝載至疏水作用層析管柱(例如，苯基管柱)上之前，將不純製劑或中間析出液或流出物之鹽(例如，NaCl)濃度調整至在約0.5 M至約2.0 M之範圍內(例如，約0.5 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M或2.0 M)且將pH調整至約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)。在裝載時，可使用包含濃度在約0.5 M至約2.0 M之範圍內(例如，約0.5 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M或2.0 M)之鹽(例如，NaCl)且在約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)之pH下之洗滌緩衝液洗滌疏水作用層析管柱。在一些實施例中，使用包含濃度在約0.1 M至約0.5 M之範圍內(例如，約0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M或0.5 M)之鹽(例如，NaCl)且在約4.5至6.0 (例如，約4.5、5.0、5.5或6.0)之pH下之溶析緩衝液溶析疏水作用層析管柱。

純化I2S蛋白質之表徵

可使用各種方法表徵經純化重組I2S蛋白質。

純度

通常藉由最終產物中所存在之各種雜質(例如，宿主細胞蛋白質或宿主細胞DNA)之含量量測經純化重組I2S蛋白質之純度。例如，可藉由ELISA或SDS-PAGE量測宿主細胞蛋白(HCP)之含量。在一些實施例中，經純化重組I2S蛋白質含有少於150 ng HCP/mg I2S蛋白質(例如，少於140 ng、130 ng、120 ng、110 ng、100 ng、90 ng、80 ng、70 ng、60 ng、50 ng、40 ng、30 ng、30 ng、20 ng、10 ng HCP/mg I2S蛋白質)。在一些實施例中，經純化重組I2S蛋白質在經受利用銀染色之SDS-PAGE時無強度大於0.05%、0.01%、0.15%、0.2%、 $\leq$

0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%或0.5%分析對照之新條帶。可使用各種分析對照，特定而言管製機關(例如FDA)可接受之彼等。

特異性活性

亦可藉由評價功能性及/或生物活性來表徵經純化重組I2S蛋白質。可使用業內已知方法測定重組I2S組合物之酶活性。通常該等方法涉及檢測硫酸根自合成受質之去除，其稱為硫酸根釋放分析。酶活性分析之一實例涉及使用離子層析法。此方法量化由重組I2S自受質酶促釋放之硫酸根離子之量。該受質可係天然受質或合成受質。在一些情形下，該受質係硫酸肝素(例如，肝素雙糖)、硫酸皮膚素或其功能性等效物。通常，藉由離子層析法利用導電率檢測器分析所釋放之硫酸根離子。在此實例中，結果可表示為U/mg蛋白質，其中1單位係定義為每小時自受質釋放1 μmole 硫酸根離子所需要之酶之量。在一些實施例中，如藉由使用肝素雙糖作為受質之活體外硫酸根釋放活性分析所量測，經純化重組I2S蛋白質具有在約0 U/mg至100 U/mg、約10 U/mg至100 U/mg、約10 U/mg至80 U/mg、約20 U/mg至80 U/mg、約20 U/mg至70 U/mg、約20 U/mg至60 U/mg、約20 U/mg至50 U/mg、約30 U/mg至100 U/mg、約30 U/mg至90 U/mg、約30 U/mg至80 U/mg、約30 U/mg至70 U/mg、約30 U/mg至60 U/mg、約40 U/mg至100 U/mg、約40 U/mg至90 U/mg、約40 U/mg至80 U/mg、約40 U/mg至70 U/mg、約40 U/mg至60 U/mg之範圍內之特異性活性。在一些實施例中，如藉由使用肝素雙糖作為受質之活體外硫酸根釋放活性分析所量測，經純化重組I2S蛋白質具有至少約5 U/mg、約10 U/mg、約15 U/mg、約20 U/mg、約25 U/mg、約30 U/mg、約35 U/mg、約40 U/mg、約45 U/mg、約50 U/mg、約55 U/mg、約60 U/mg、約65 U/mg、約70 U/mg、約75 U/mg、約80 U/mg、約85 U/mg、約90 U/mg、約95 U/mg或約100 U/mg之特異性活性。下文提供實施使用肝

素雙糖作為受質之活體外硫酸根釋放活性分析之實例性條件。通常，此分析量測I2S自天然來源之受質肝素二糖釋放硫酸根離子之能力。可藉離子層析法量化所釋放之硫酸根。在一些情形下，離子層析法配備有導電率檢測器。作為非限制性實例，首先將樣品緩衝交換至10 mM乙酸鈉(pH 6)，以消除調配物緩衝液中之磷酸根離子所造成之抑制。然後利用反應緩衝液(10 mM乙酸鈉，pH 4.4)將樣品稀釋至0.075 mg/ml，並在37°C下以30 μ L反應體積中0.3 μ g I2S/100 μ g受質之酶對受質比率與肝素雙糖一起培育2 hr。然後藉由在100°C下將樣品加熱3 min來終止該反應。使用具有IonPac AG18保護管柱之Dionex IonPac AS18分析管柱實施該分析。利用30 mM氫氧化鉀以1.0 mL/min使用等度方法，並持續15分鐘。自在1.7奈莫耳至16.0奈莫耳範圍內之硫酸根標準物之線性回歸分析計算由I2S樣品釋放之硫酸根之量。可報告值係表示為單位/mg蛋白質，其中1單位係定義為每小時釋放1 μ mole硫酸根，且蛋白質濃度係藉由A280量測來測定。

在一些實施例中，亦可使用業內已知之各種其他方法測定重組I2S蛋白質之酶活性，例如4-MUF分析，其量測4-甲基傘形酮基-硫酸酯至硫酸鹽及天然螢光4-甲基傘形酮(4-MUF)之水解。在一些實施例中，如藉由活體外4-MUF分析所量測，所產生之重組I2S蛋白質之期望酶活性為至少約0.5 U/mg、1.0 U/mg、1.5 U/mg、2 U/mg、2.5 U/mg、3 U/mg、4 U/mg、5 U/mg、6 U/mg、7 U/mg、8 U/mg、9 U/mg、10 U/mg、12 U/mg、14 U/mg、16 U/mg、18 U/mg或20 U/mg。在一些實施例中，如藉由活體外4-MUF分析所量測，所產生之重組I2S蛋白質之期望酶活性係在約0 U/m-50 U/mg (例如，約0 U/m-40 U/mg、約0 U/m-30 U/mg、約0 U/m-20 U/mg、約0 U/m-10 U/mg、約2 U/m-50 U/mg、約2 U/m-40 U/mg、約2 U/m-30 U/mg、約2 U/m-20 U/mg、約2 U/m-10 U/mg、約4 U/m-50 U/mg、約4 U/m-40 U/mg、約4 U/m-30 U/mg、約4 U/m-20 U/mg、約4 U/m-10 U/mg)。

U/mg、約4 U/m-30 U/mg、約4 U/m-20 U/mg、約4 U/m-10 U/mg、約6 U/m-50 U/mg、約6 U/m-40 U/mg、約6 U/m-30 U/mg、約6 U/m-20 U/mg、約6 U/m-10 U/mg)之範圍內。下文提供實施活體外4-MUF分析之實例性條件。通常，4-MUF分析量測I2S蛋白質將4-甲基傘形酮基-硫酸酯(4-MUF-SO₄)水解成硫酸鹽及天然螢光4-甲基傘形酮(4-MUF)之能力。1毫單位之活性係定義為在37°C下於1分鐘內將1奈莫耳之4-MUF-SO₄轉化成4-MUF所需要之酶之量。通常，亦可使用由具有已知活性之I2S測試樣品生成之平均螢光單位(MFU)生成標準曲線，其可用於計算所關注樣品之酶活性。然後可藉由將酶活性除以蛋白質濃度來計算特異性活性。

在任一實例中，可藉由業內已知用於測定蛋白質濃度之任何適宜方法測定重組I2S組合物之蛋白質濃度。在一些情形下，藉由紫外光吸光度分析測定蛋白質濃度。通常在約280 nm波長(A₂₈₀)下實施該等吸光度分析。

電荷剖面

可藉由與蛋白質相關之電荷剖面表徵經純化重組I2S。通常，蛋白質電荷剖面反映通常蛋白質表面所存在之殘基側鏈電荷之型式(pattern)。可藉由對蛋白質實施離子交換(IEX)層析法(例如，HPLC)分析來測定電荷剖面。在一些實施例中，「電荷剖面」係指一組代表在添加至含有交換離子之流動相之管柱後之時間點處自離子交換管柱溶析之蛋白質之量之值。

通常，適宜離子交換管柱係陰離子交換管柱。例如，可藉由使用高效液體層析法(HPLC)系統之強陰離子交換(SAX)層析法測定電荷剖面。一般而言，重組I2S吸附至強陰離子交換管柱之固定正電荷，且使用預定流速流動相之漸增離子強度之梯度隨重組I2S種類與帶正電荷之管柱之離子相互作用之強度而成比例地自管柱溶析重組I2S種

類。帶較多負電荷(酸性更高)之I2S種類遲於帶較少負電荷(酸性更低)之I2S種類溶析出。藉由紫外光吸光度(在280 nm下)檢測析出液中之蛋白質濃度。

在一些實施例中，重組I2S在約pH 8.0下於20 mM TRIS-HCl中吸附至Mini Q PE管柱之固定正電荷上，且使用流速為0.8 ml/min之由20 mM TRIS-HCL、1 M氯化鈉組成之pH 8.0流動相之漸增離子強度之梯度隨重組I2S種類與帶正電荷之管柱之離子相互作用之強度而成比例地自管柱溶析重組I2S種類。

在一些實施例中，可藉由自HPLC管柱溶析後吸光度單位對時間之層析圖繪示電荷剖面。層析圖可包含一組一或多個峰，其中該組中之每一峰識別組合物中具有類似表面電荷之重組I2S子群。

在一些實施例中，經純化I2S蛋白質組合物在其電荷剖面中呈現至少6個峰。I2S之實例性電荷剖面係繪示於實例部分及圖11中。如圖11中所顯示，按漸增負電荷及對層析圖之總峰面積之漸減貢獻之次序標記(A至F) 6個峰。在一些實施例中，經純化重組I2S組合物之電荷剖面含有不同之峰之數量、大小、形狀或時間間隔，此取決於蛋白質表面之負或正電荷之量。在一些實施例中，重組I2S組合物具有包括少於6個(例如，少於5個、4個、3個或2個)峰之電荷剖面。在一些實施例中，重組I2S之電荷剖面可具有5個、4個、3個、2個或1個峰。例如，峰A、B、C、D、E及F中之任一者、兩者、三者、四者或五者在經純化重組I2S蛋白質組合物中可不存在或減少。通常，若存在較少峰，則認為電荷剖面更均質。

聚糖映射

在一些實施例中，可藉由蛋白聚糖組合物表徵經純化重組I2S蛋白質，通常稱為聚糖映射。不希望受任一理論之限制，認為聚糖鍵聯連同分支結構之形狀及複雜性可影響活體內清除、溶酶體靶向、生物s

可用度及/或效力。

通常，可藉由酶消化及後續層析分析來測定聚糖圖譜。可使用各種酶用於酶消化，包括(但不限於)適宜糖基化酶、肽酶(例如，內肽酶、外肽酶)、蛋白酶及磷酸酶。在一些實施例中，適宜酶係鹼性磷酸酶。在一些實施例中，適宜酶係神經胺酸酶。可藉由層析分析檢測聚糖(例如，磷酸聚糖)。例如，可藉由利用脈衝電流檢測(HPAE-PAD)之高效陰離子交換層析法或粒徑排阻高效液體層析法(HPLC)檢測磷酸聚糖。可根據業內已知且本文中所揭示之方法使用聚糖(例如，磷酸聚糖)之標準曲線計算聚糖圖譜上每一峰所代表之聚糖(例如，磷酸聚糖)之量。

在一些實施例中，本發明之經純化I2S呈現包含7個分別指示中性(峰群組1)、經單唾液酸基化(峰群組2)、經二唾液酸基化(峰群組3)、經單磷酸化(峰群組4)、經三唾液酸基化(峰群組5)、經四唾液酸基化(峰群組6)及經二磷酸化(峰群組7) I2S蛋白質之峰群組之聚糖圖譜。I2S之實例性聚糖圖譜係繪示於圖10中。在一些實施例中，經純化重組I2S具有包括少於7峰群組之聚糖圖譜(例如，具有6個、5個、4個、3個或2個峰群組之聚糖圖譜)。在一些實施例中，經純化重組I2S具有包括多於7峰群組(例如，8個、9個、10個、11個、12個或更多個)之聚糖圖譜。

可基於相對於預定參照標準中之相應峰群組面積之峰群組面積測定與每一峰群組相對應之聚糖之相對量。在一些實施例中，峰群組1(中性)具有相對於參照標準中之峰群組面積在約40%至120%(例如，約40%至115%、約40%至110%、約40%至100%、約45%至120%、約45%至115%、約45%至110%、約45%至105%、約45%至100%、約50%至120%、約50%至110%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中，峰群組2(經單唾液酸基化)具有相對於參照標準中之峰

群組面積在約80%至140% (例如, 約80%至135%、約80%至130%、約80%至125%、約90%至140%、約90%至135%、約90%至130%、約90%至120%、約100%至140%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中, 峰群組3 (經二唾液酸基化)具有相對於參照標準中之峰群組面積在約80%至110% (例如, 約80%至105%、約80%至100%、約85%至105%、約85%至100%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中, 峰群組4 (經單磷酸基化)具有相對於參照標準中之峰群組面積在約100%至550% (例如, 約100%至525%、約100%至500%、約100%至450%、約150%至550%、約150%至500%、約150%至450%、約200%至550%、約200%至500%、約200%至450%、約250%至550%、約250%至500%、約250%至450%或約250%至400%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中, 峰群組5 (經三唾液酸基化)具有相對於參照標準中之峰群組面積在約70%至110% (例如, 約70%至105%、約70%至100%、約70%至95%、約70%至90%、約80%至110%、約80%至105%、約80%至100%或約80%至95%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中, 峰群組6 (經四唾液酸基化)具有相對於參照標準中之峰群組面積在約90%至130% (例如, 約90%至125%、約90%至120%、約90%至115%、約90%至110%、約100%至130%、約100%至125%或約100%至120%)之範圍內之峰群組面積。在一些實施例中, 峰群組7 (經二磷酸基化)可具有相對於參照標準中之峰群組面積在約70%至130% (例如, 約70%至125%、約70%至120%、約70%至115%、約70%至110%、約80%至130%、約80%至125%、約80%至120%、約80%至115%、約80%至110%、約90%至130%、約90%至125%、約90%至120%、約90%至115%、約90%至110%)之範圍內之峰群組面積。聚糖映射之各種參照標準為業內已知, 且可用於實踐本發明。通常, 峰群組7 (經二磷酸基化)與經純化重組I2S蛋白質表面之di-M6P之含量相對

應。

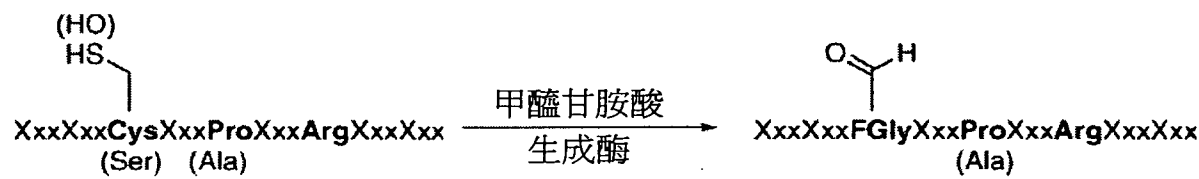
預期經純化I2S之糖基化型式影響溶酶體靶向。各種活體外細胞攝取分析為業內已知，且可用於實踐本發明。例如，為評價M6P受體對I2S之攝取，使用於其表面表現M6P受體之人類纖維母細胞實施細胞攝取分析。可藉由ELISA方法量測I2S之經內化量。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質係以大於70%、75%、80%、85%、90%、95%之細胞攝取為特徵，如藉由活體外攝取分析所測定。

肽映射

在一些實施例中，可使用肽映射表徵胺基酸組合物、轉譯後修飾及/或細胞處理；例如信號肽裂解、甲醯甘胺酸轉化及/或糖基化。通常，可藉助受控或隨機斷裂將重組蛋白質破碎為離散肽片段，以產生型式或肽圖譜。在一些情形下，經純化I2S蛋白質可首先經酶消化，然後進行分析性分析。可使用肽酶、糖苷水解酶、磷酸酶、脂酶或蛋白酶及/或其組合實施消化，然後實施分析性分析。可使用業內熟知方法測定肽之結構組成。實例性方法包括(但不限於)質譜法、核磁共振(NMR)或HPLC。

甲醯甘胺酸轉化百分比

可使用肽映射測定FGly轉化百分比。如上文所論述，I2S活化要求半胱胺酸(與成熟人類I2S之59位相對應)藉由甲醯甘胺酸生成酶(FGE)轉化至甲醯甘胺酸，如下文所顯示：



因此，可使用下式計算甲醯甘胺酸轉化百分比(%FG)：

$$\%FG (DS) = \frac{\text{活性 I2S 分子數}}{\text{總(活性+非活性) I2S 分子數}} \times 100$$

為計算%FG，可使用蛋白酶(例如，胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶)將重組I2S蛋白質消化成短肽。可分離短肽並使用(例如)粒徑排阻高效液體層析法(HPLC)進行表徵。可表徵含有與成熟人類I2S之59位相對應之位置之肽，以確定與對照(例如，無FGly轉化之I2S蛋白質或具有100% FGly轉化之I2S蛋白質)相比59位處之Cys是否轉化成FGly。可基於相應峰面積測定含有FGly之肽之量(與活性I2S分子數相對應)及含有FGly及Cys二者之肽之總量(與總I2S分子數相對應)，且可計算反映%FG之比率。

在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質具有與人類I2S (SEQ ID NO:1)之Cys59相對應之半胱胺酸殘基至C α -甲醯甘胺酸(FGly)之至少約70% (例如，至少約77%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)轉化。在一些實施例中，本發明之經純化重組I2S蛋白質具有與人類I2S (SEQ ID NO:1)之Cys59相對應之半胱胺酸殘基至C α -甲醯甘胺酸(FGly)之實質上100%轉化。

唾液酸含量

在一些實施例中，可藉由唾液酸組合物表徵經純化重組I2S蛋白質。不希望受理論限制，預期蛋白質上之唾液酸殘基可防止、減少或抑制其經由肝細胞上存在之去唾液酸糖蛋白受體在活體內快速清除。因此，認為具有相對較高唾液酸含量之重組蛋白質通常具有相對較長之活體內循環時間。

在一些實施例中，可使用業內熟知方法測定經純化重組I2S蛋白質之唾液酸含量。例如，可藉由酶消化及後續層析分析測定重組I2S蛋白質之唾液酸含量。可使用任何適宜唾液酸酶實現酶消化。在一些

情形下，藉由糖苷水解酶(例如神經胺酸酶)實施消化。可藉由層析分析(例如，利用脈衝電流檢測(HPAE-PAD)之高效陰離子交換層析法)檢測唾液酸。可根據業內已知且本文中所揭示之方法使用唾液酸之標準曲線計算重組I2S組合物中之唾液酸之量。

在一些實施例中，經純化重組I2S蛋白質之唾液酸含量可大於16 mol/mol。在唾液酸含量之上下文中，單位「mol/mol」係指每莫耳酶之唾液酸殘基莫耳數。在一些情形下，重組I2S蛋白質之唾液酸含量為或大於約16.5 mol/mol、約17 mol/mol、約18 mol/mol、約19 mol/mol、約20 mol/mol、約21 mol/mol、約22 mol/mol或更多。在一些實施例中，經純化重組I2S蛋白質之唾液酸含量可在介於約16 mol/mol至20 mol/mol之間、16 mol/mol至21 mol/mol、約16 mol/mol至22 mol/mol、16 mol/mol至23 mol/mol、16 mol/mol至24 mol/mol、約16 mol/mol至25 mol/mol、約17 mol/mol至20 mol/mol、17 mol/mol至21 mol/mol、約17 mol/mol至22 mol/mol、17 mol/mol至23 mol/mol、17 mol/mol至24 mol/mol或約17 mol/mol至25 mol/mol之範圍內。

醫藥組合物及投與

可依照已知方法將經純化重組I2S蛋白質投與韓特氏症候群患者。例如，可經靜脈內、經皮下、經肌內、非經腸、經皮或經黏膜(例如，經口或經鼻))遞送經純化重組I2S蛋白質。

在一些實施例中，藉由靜脈內投與將重組I2S或含其之醫藥組合物投與受試者。

在一些實施例中，藉由鞘內投與將重組I2S或含其之醫藥組合物投與受試者。本文所使用之術語「鞘內投與」或「鞘內注射」係指注射至脊髓管(脊髓周圍之空間鞘內)中。可使用各種技術，包括(但不限於)藉助鑽孔或腦池或腰椎穿刺或諸如此類之側腦室注射。在一些實

施例中，本發明之「鞘內投與」或「鞘內遞送」係指經由腰部(lumbar area or region)之IT投與或遞送，即腰椎IT投與或遞送。本文所使用之術語「腰部」(「lumbar region」或「lumbar area」)係指介於第三與第四腰椎(下背)之間之區域及更囊括性地脊柱之L2-S1區。

在一些實施例中，藉由皮下(即在皮膚下方)投與將重組I2S或含其之醫藥組合物投與受試者。出於該等目的，可使用注射器注射該調配物。然而，可用投與該調配物之其他裝置，例如注射裝置(例如，Inject-ease™及Genject™裝置)；注射筆(例如GenPen™)；無針裝置(例如，MediJector™及BioJector™)；及皮下貼片遞送系統。

在一些實施例中，鞘內投藥法可與其他投藥途徑(例如，靜脈內、經皮下、經肌內、非經腸、經皮或經黏膜(例如，經口或經鼻))組合使用。

本發明涵蓋單次投與及多次投與治療有效量之本文中所闡述之重組I2S或含其之醫藥組合物。可定期投與重組I2S或含其之醫藥組合物，此取決於個體之病狀(例如，溶酶體貯積病)之性質、嚴重性及程度。在一些實施例中，可定期(例如，每年一次、每六個月一次、每五個月一次、每三個月一次、每兩個月(每兩個月一次)、每月(每月一次)、每兩週(每兩週一次)、每週、每天或連續地)週期性投與治療有效量之重組I2S或含其之醫藥組合物。

可將重組I2S或含其之醫藥組合物與生理上可接受之載體或賦形劑一起調配，以製備醫藥組合物。載體及治療劑可係無菌。該調配物應配合投藥模式。

適宜醫藥上可接受之載體包括(但不限於)水、鹽溶液(例如，NaCl)、鹽水、緩衝生理食鹽水、醇類、甘油、乙醇、阿拉伯膠、植物油、苧醇、聚乙二醇、明膠、碳水化合物(例如，乳糖、直鏈澱粉或澱粉)、糖(例如，甘露醇、蔗糖或其他)、右旋糖、硬脂酸鎂、滑石

粉、矽酸、黏性石蠟、香料油、脂肪酸酯、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮等等，及其組合。若需要，可將醫藥製劑與不會與活性化合物產生不利反應或干擾其活性之助劑混合(例如，潤滑劑、防腐劑、穩定劑、濕潤劑、乳化劑、用於影響滲透壓之鹽、緩衝液、著色劑、矯味劑及/或芳香物質及諸如此類)。在一些實施例中，使用適宜於靜脈內投與之水溶性載體。

若需要，該組合物或醫藥亦可含有少量濕潤劑或乳化劑或pH緩衝劑。該組合物可係液體溶液、懸浮液、乳液、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放調配物或粉劑。該組合物亦可使用常用黏合劑及載體(例如三酸甘油酯)調配成栓劑。經口調配物可包括標準載體，例如醫藥級之甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯啉酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。

可依照常規程序將該組合物或醫藥調配成適於投與人類之醫藥組合物。例如，在一些實施例中，用於靜脈內投與之組合物通常係存於無菌等滲水性緩衝液中之溶液。在需要時，該組合物亦可包括增溶劑及減輕注射部位之疼痛之局部麻醉劑。一般而言，單獨供應各成份或將各成份一起混合於單位劑型中，例如呈凍乾乾粉或無水濃縮物形式，存於指示活性劑之量之氣密性密封容器(例如安瓿或藥囊)中。若欲藉由輸注投與該組合物，則可將其分配至含有無菌醫藥級水、鹽水或右旋糖/水之輸注瓶中。若藉由注射投與該組合物，則可提供注射用無菌水或鹽水之安瓿，以使得可在投與前混合各成份。

本文所使用之術語「治療有效量」主要係基於本發明醫藥組合物中所含有之治療劑總量來測定。一般而言，治療有效量足以達成對受試者之有意義益處(例如，治療、調節、治癒、預防及/或改善潛在疾病或病狀)。例如，治療有效量可係足以達成期望治療及/或預防效應之量，例如足以調節溶酶體酶受體或其由此治療該溶酶體貯積病或

其症狀之活性之量(例如，在將本發明組合物投與受試者後降低或消除「斑馬體」或細胞液泡形成之存在或發病率)。一般而言，投與有需要之受試者之治療劑(例如，重組溶酶體酶)之量將取決於受試者之特徵。該等特徵包括受試者之狀況、疾病嚴重性、總體健康、年齡、性別及體重。熟習此項技術者將容易能夠視該等及其他有關因素而確定適當劑量。另外，可視情況採用客觀性及主觀性分析二者來確定最佳劑量範圍。

治療有效量通常係以可包含多個單位劑量之給藥方案投與。對於任一特定治療性蛋白質而言，治療有效量(及/或在有效給藥方案內之適當單位劑量)可視(例如)投與途徑、與其他醫藥劑之組合而變化。此外，任一特定患者之具體治療有效量(及/或單位劑量)可視多種因素而定，包括所治療病症及該病症之嚴重性；所採用之具體醫藥劑之活性；所採用之具體組合物；患者之年齡、體重、總體健康、性別及飲食；所採用之具體融合蛋白之投與時間、投與途徑及/或排泄或代謝速率；治療持續時間；及醫學技術內熟知之類似因素。

其他實例性醫藥組合物及投與方法係闡述於標題為「Methods and Compositions for CNS Delivery of Iduronate-2-Sulfatase」之PCT公開案 WO2011/163649；及於2012年3月30日申請之標題為「Subcutaneous administration of iduronate 2 sulfatase」之臨時申請案第61/618,638號中，其二者之整個揭示內容以引用的方式併入本文中。

亦應理解，對於任一特定受試者，具體劑量方案應根據個體需要及酶替代療法投與者或監督酶替代療法投與者之專業判斷來隨時間進行調整，且本文中所闡釋之劑量範圍僅為實例性的，且並不意欲限制所主張發明之範圍或實踐。

實例

實例1：重組I2S AF捕獲及純化製程

此實例證明簡化之下游純化製程可用於捕獲並純化於無血清培養基中所產生之重組I2S。實例性純化方案係繪示於圖1中。

研發穩定表現艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)及甲醯甘胺酸生成酶(FGE)之細胞系。實例性細胞系之生成及表徵係闡述於與其於同一日期申請之標題為「Cells for Producing Recombinant Iduronate-2-Sulfatase」之美國臨時申請案中，其整個內容以引用的方式併入本文中。簡言之，人類細胞系係經改造以共同表現具有於SEQ ID NO:2中所顯示之胺基酸序列之人類I2S蛋白質及具有於SEQ ID NO:5中所顯示之胺基酸序列之人類甲醯甘胺酸生成酶(FGE)。

SEQ ID NO: 2

> 全長前體艾杜糖醛酸鹽2-硫酸酯酶

MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIV
 DDLRPSLG CYGDKLVRSPNIDQLASHSL LFQNAFAQQAVCAPSRVSFL
 TGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFH
 PGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGP DGELHANLLCPV
 DVLDVPEGTL PDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPF FLAVGYHKPHIPFRY
 PKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNIS
 VPYGPIPVDFQRKIRQSYFASVS YLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAF
 TSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLF
 PYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPS
 FHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQ
 WNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVG FNPDEFLANFSDIHAGEL
 YFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:5

全長人類FGE前體：

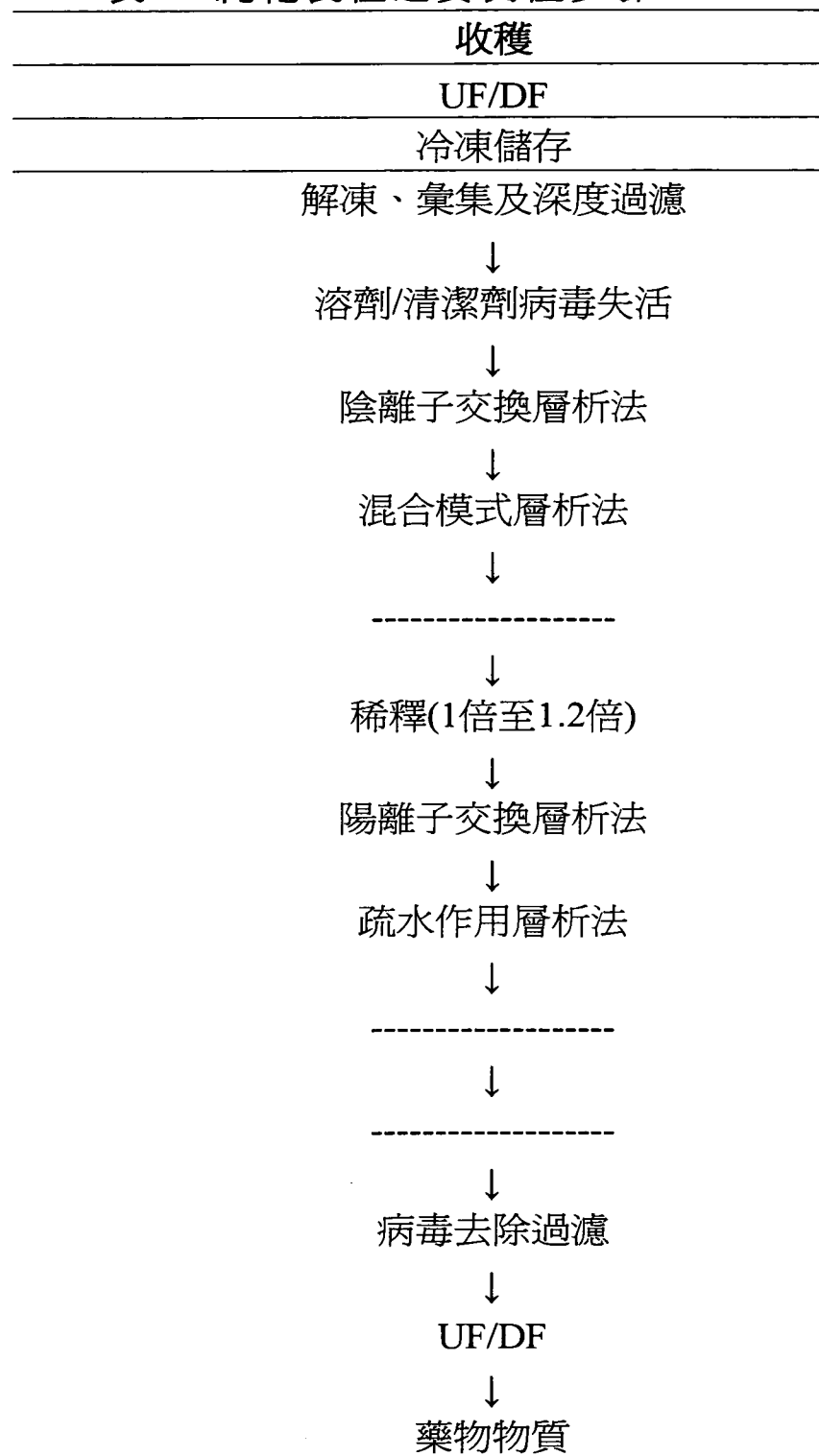
MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGA
 GSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSSREANAPGPVPPERQLAHS
 KMOVPIAGVFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTF
 EKFNSTGYLTEAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPWWLP
 VKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTE
 AEWEYSCRGGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGED
 GFQGTAPVDAFPNGYGLYNIVGNAWEWTSDWWTVHHSVEETLNPK
 GPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRC
 AADRLPTMD

合成全長I2S酶後，去除25個胺基酸信號肽，且自該細胞分泌可溶性成熟I2S酶。

在生物反應器製程中使用化學配方培養基(無血清/無動物組份；AF)。

減少個別收穫材料之體積並藉助超濾/滲濾製程進行緩衝交換。根據個別收穫將該材料(稱為未經純化原液(UPB))於-50℃下冷凍。下游純化製程以未經純化原液之解凍及彙集開始，且包括相繼之病毒失活、陰離子交換(Capto Q)、混合模式(陶瓷羥磷灰石)、陽離子交換(SP瓊脂糖)及疏水作用(苯基瓊脂糖)層析步驟、接著病毒過濾及最後濃縮及滲濾步驟。特定而言，此純化製程利用Q、羥磷灰石、SP及苯基層析形式。去除I2S純化製程中傳統上使用之蛋白質G層析法及粒徑排阻層析法。實例性步驟係顯示於表3中。

表3：純化製程之實例性步驟



藉由肽映射、SDS-PAGE (銀)、粒徑排阻HPLC評估純化I2S蛋白質之純度。使用標準方法測定酶特異性活性、甲醯甘胺酸含量、唾液酸含量、聚糖圖譜、電荷剖面。實例性結果係顯示於表4中。

表4：經純化重組I2S蛋白質之分析

分析		經純化I2S (10 L規模) Min-Max (n)
肽映射	L1	100%至105% (n=3)
	L10	98%至100% (n=3)
	L12	102%至102% (n=3)
	L13	96%至97% (n=3)
	L14	102%至103% (n=3)
	L17	101%至101% (n=3)
	L20	102%至103% (n=3)
宿主細胞蛋白質		≤62.5 (n=5)
SDS-PAGE (銀)		符合
離子交換 HPLC	峰A%	69%至69% (n=2)
	峰B%	20%至21% (n=2)
	峰E+F%	10%至11% (n=2)
粒徑排阻 HPLC		99.9%至99.9% (n=5)
細胞攝取 (生物分析)		85%、95%及97% (n=3)
甲醯甘胺酸%		87%至95% (n=5)
特異性活性		62%至78 (n=5)
聚糖圖譜	峰群組3	88%至93% (n=5)
	峰群組5	72%至110% (n=5)
	峰群組6	124%至133% (n=5)
	峰群組7	78%至87% (n=5)
	總面積	94%至116% (n=5)
唾液酸		16至22 (n=4)
內毒素		<0.04至<0.05 (n=2)
生物負荷		0.00至0.00 (n=2)

與市售I2S參照物相比之實例性肽圖譜係顯示於圖2中。實例性SDS-PAGE (銀) 分析結果係顯示於圖3中。通常，使用本文中所闡述之製程，藥物物質(DS)之HCP濃度為<100 ppm，滿足許多市場(包括US)所要求之<100 ppm規格。DS之SEC為≥99.5%，亦滿足目前許多市場中>99.3%之銷售規格要求。實例性電荷剖面係顯示於圖4中。實例性聚糖圖譜係顯示於圖5中。特定而言，經純化I2S之聚糖圖譜包括7個峰群組，根據源於唾液酸及甘露醇-6-磷酸鹽殘基之漸增量之負電荷溶析，按溶析之次序代表中性、經單唾液酸基化、經二唾液酸基化、經單磷酸基化、經三唾液酸基化及混合(經單唾液酸基化且經M6P封端)、經四唾液酸基化及混合(經二唾液酸基化且經M6P封端)及經二磷酸化之聚糖。

總之，此實例證明簡化之四管柱純化製程可用於成功地大規模純化於無動物源性培養基中產生之重組I2S。

實例2：重組I2S AF之收穫及病毒失活穩定性研究

此研究之目的係評價溫度保持時間及冷凍-解凍循環對重組I2S澄清收穫物之穩定性之影響。

將澄清收穫物樣品存儲於室溫及2℃至8℃下長達7天，且將病毒失活之UPB樣品保持於室溫下長達24小時。於-20℃、-50℃及-80℃下冷凍澄清收穫物之冷凍-解凍樣品，並經歷冷凍-解凍長達3個循環。使用西方墨點(Western blot)、SEC HPLC及活性分析量測穩定性。

藉由CCPD使用具有離心滯留裝置及期望沁水率之B. Braun 20 L生物反應器自2D細胞系產生I2S-AF收穫材料。對於溫度保持研究，將每一澄清收穫物存儲於室溫及2℃至8℃下，並在選定保持時間處取樣。取樣量及保持時間係列示於表5中。將冷凍-解凍樣品存儲於-20℃、-50℃及-80℃下，並使用25℃水浴解凍。

表5. 澄清收穫物保持點穩定性

	樣品	保持溫度	保持時間(天)
澄清收穫物12	15×0.5 mL	2°C至8°C	T=0 h、24 h、76 h、120 h、168 h
	15×0.5 mL	室溫	T=0 h、24 h、76 h、120 h、168 h
	9×0.5 mL	-20°C、-50°C及-80°C	冷凍/解凍1、2及3
澄清收穫物18	15×0.5 mL	2°C至8°C	T=0 h、24 h、76 h、120 h、168 h
	15×0.5 mL	室溫	T=0 h、24 h、76 h、120 h、168 h
	9×0.5 mL	-20°C、-50°C及-80°C	冷凍/解凍1、2及3

在裝載第一管柱之前，在未經純化原液步驟時進行病毒失活步驟。藉由澄清收穫物之濃縮及緩衝交換產生UPB。使用Pall 1 sq. ft. Centramate系統實施UF/DF，並緩衝交換至10 mM MES、155 mM NaCl (pH=6.5)中。病毒失活步驟添加1%吐溫80 (Tween 80)及0.3% TnBP，針對每一時間點使用Durapore注射器過濾器進行過濾。於表6中所列示之每一時間點處獲取樣品，並於-80°C下冷凍。藉由西方墨點及活性(4-MU分析)測試得自澄清收穫物保持點及冷凍-解凍研究之樣品。藉由SEC HPLC測試得自病毒失活之UPB樣品之純度。表5之收穫物12及18之保持點活性結果顯示兩種收穫物在長達7天儲存內於室溫及2°C至8°C下無顯著變化。於-20°C、-50°C及-80°C下存儲長達3個冷凍-解凍循環，收穫物12活性無顯著變化。

表6.未經純化原液之病毒失活

	樣品	保持溫度	保持時間(天)
病毒失活	9×0.5 mL	室溫，對照	T=0 h、6 h、24 h
	9×0.5 mL	室溫，病毒失活	T=0 h、6 h、24 h

病毒失活UPB步驟之活性以及穩定性之SEC-HPLC係闡述於圖6及7中。此顯示基於長達24小時之活性及純度，病毒失活穩定性沒有任何問題。

總而言之，基於本文中所闡述之穩定性分析，可將澄清收穫物存儲於2℃至8℃下(例如，長達7天)，且收穫物品質無顯著變化。澄清收穫物可經歷多個冷凍-解凍循環，並存儲於-20℃、-50℃及-80℃溫度下，且穩定性無顯著變化。基於SEC HPLC純度結果，UPB步驟時之病毒失活可於室溫下進行(例如，長達24小時)，且活性及純度無變化。

實例3：無動物源性IL CD培養基確認試驗之純化及分析

此研究之目的係實施自於使用化學配方培養基之無動物成份灌注液中產生之I2S-AF之經彙集收穫物的純化及表徵該藥物物質。

此研究評價I2S-AF純化製程性能及自化學配方培養基生物反應器產生之藥物物質(DS)。

細胞培養物

如實例1中所闡述自表現I2S及甲醯甘胺酸生成酶(FGE))之細胞系2D產生I2S-AF材料。在CCPD中於1 L Das Gip旋轉過濾生物反應器中使用化學配方無血清培養基產生該材料。使每一澄清收穫物(HI-21)之個別袋接受於-20℃下之冷凍並於2℃至8℃下之解凍過夜。彙集相等體積之每一澄清收穫物，以代表整個收穫物庫，然後進行0.2 μm過濾，並使用具有1 ft²之總膜面積之30 kD Pall Omega Centramate盒進行濃縮。對未經純化原液(UPB)進行0.2 μm過濾，並在使用前冷凍。

純化

實例性管柱規格及裝載係闡述於表7中。藉由滴定以3 g/L為目標裝載Q瓊脂糖。以來自先前管柱溶析之100%裝載後續管柱，且不去除任何材料。

表7. 管柱及裝載規格

管柱	管柱尺寸 (cm×cm)	管柱體積 (mL)	管柱負載 (g I2S /L樹脂)	管柱負載 (mg)
Q瓊脂糖	2.6×25	133	3	399
HA Type II, 80 μm	1.6×30	60	5.5	330
苯基瓊脂糖	1.6×23	46	5.6	258

使用來自生物反應器之彙集收穫物1至21之UPB實施一次純化試驗。將UPB於2℃至8℃下解凍過夜，並以每一收穫物之相等體積彙集。

個別管柱製程步驟及緩衝液調配物可見於表8至11。在裝載至Q瓊脂糖FF管柱上之前，使用0.2 μm瓶過濾器系統過濾經彙集UPB，使用1 M乙酸鈉調整至pH 6.5，且利用5 M氯化鈉將導電率調整至16 mS/cm。在裝載至HA管柱上之前，使用0.25M NaP0₄ (pH 5.5)將Q瓊脂糖溶析調整至0.001 M NaP0₄，並利用0.22 μm PES瓶頂過濾器過濾。利用5 M NaCl將HA溶析導電率調整至1.55 M NaCl，並利用1 M乙酸鈉將pH調整至pH 5.5。調整時間為大約1小時。在裝載至苯基瓊脂糖管柱上之前，使用0.22 μm PES瓶頂過濾器過濾經調整庫。4×濃縮苯基溶析，並6×滲濾至0.02 M NaP0₄、0.137 M NaCl (pH 6.0)中。將經滲濾產物調整至2.0 g/L，並與0.2%聚山梨醇酯20一起調配，以生成模擬藥物物質。創建DS之H1-20模擬庫用於其他表徵。

表8. Q瓊脂糖FF層析法之實例性製程細節

製程步驟	流速(cm/hr)	CV	緩衝液
衛生處理	150	3	0.5 N NaOH
平衡	150	4	0.01 M MES、0.155 M NaCl, pH 6.5
洗滌1	150	2	0.01 M MES、0.155 M NaCl, pH 6.5
洗滌2	150	3	0.01 M MES、0.155 M NaCl, pH 5.5
溶析	150	3	0.01 M MES、0.50 M NaCl, pH 5.5
清潔/汽提	150	4	1.0 M NaOH、2 M NaCl
存儲	150	4	0.0 N NaOH

表9. HA層析法之實例性製程細節

製程步驟	流速 (cm/hr)	CV	緩衝液
衛生處理	200	3	0.5 N NaOH
裝填	200	3	0.250 M NaPO ₄ , pH 5.5
平衡	200	3-6	0.01 M MES、0.001 M NaPO ₄ 、0.5 M NaCl, pH 5.5
洗滌1	200	1	0.01 M MES、0.001 M NaPO ₄ 、0.5 M NaCl, pH 5.5
洗滌2	200	6	0.01 M MES、0.01 M NaPO ₄ 、0.5 M NaCl, pH 5.5
溶析	200	3	0.01 M MES、0.08 M NaPO ₄ , pH 5.5
汽提	200	4	0.4 M NaPO ₄ pH 12
清潔	200	4	0.5 N NaOH
存儲	200	4	0.1 N NaOH

表10.苯基瓊脂糖層析法之實例性製程細節

製程步驟	流速(cm/hr)	CV	緩衝液
衛生處理	150	3	0.5 N NaOH
平衡	150	4-6	0.02 M MES、1.5 M NaCl, pH 5.5
洗滌	150	2	0.02 M MES、1.5 M NaCl, pH 5.5
溶析	150	3	0.02 M MES、0.2 M NaCl, pH 5.5
水洗滌	150	3	RO/DI水
乙醇洗滌	150	3	20%乙醇
清潔	150	3	0.5 N NaOH
存儲	150	3	0.01 N NaOH

表11.苯基溶析庫之實例性滲濾

過濾單元	Centricon Plus 70
滲濾緩衝液	0.02 M NaPO ₄ 、0.137 M NaCl, pH 6.0
滲濾體積	6X-8X

藉由ELISA得到之HCP之製程中純度

表12闡述每一步驟之製程中去除之HCP。製程中HCP結果為大部份已在HA步驟時去除。

表12. 製程中HCP去除

步驟	HCP (ng/mg)	LRV	HCP倍數
Q	46,392	0.3	2
	51,957		
HA	51,957	1.3	18
	5,876		
苯基	5,876	0.7	5
	1,870		

藥物物質表徵

實例性藥物物質批次釋放結果係列示於表13中，可以看到，藥

物物質具有較高之特異性活性及於經純化材料中之%FG。實例性藥物屬性表徵係顯示於表13中。HCP在最後UF/DF步驟時自1,870 ng/mg降至372 ng/mg。

表13. 實例性藥物物質批次釋放

DS批次釋放	1 L CD培養基 (I2S-AF)
%FG	94%
聚糖圖譜	
群組3	99%
群組5	89%
群組6	104%
群組7 (2-M6P)	95%
總面積	107%
唾液酸	17
內化	83%
SEC-HPLC	99.9%
特異性活性 (U/mg)	82
IEX HPLC	
A (%)	64%
B (%)	23%
A+B	87%
E+F	0%
宿主細胞蛋白質	372
細胞攝取	98

實例4.經純化重組I2S酶之生理化學及生物表徵

該實例之目的係實施使用上文所闡述方法純化之重組I2S蛋白質之詳細表徵。

SDS-PAGE

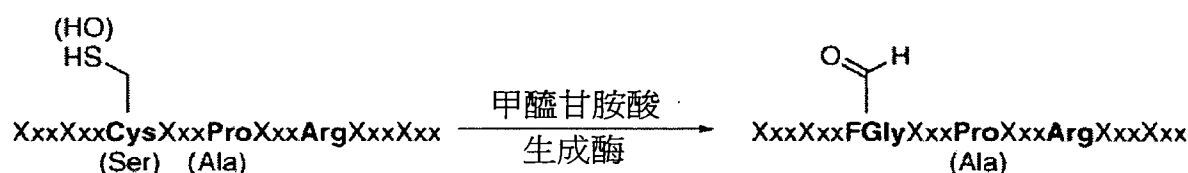
對於該實驗，使用2D及4D人類細胞系在兩個單獨無血清細胞培養物反應中生成重組I2S蛋白質。使用上文所闡述方法收集並純化樣品。藉由SDS-PAGE分析經純化I2S酶，並用銀染色劑處理用於可視化。實例性結果係顯示於圖8中，自圖8可見，使用本文中所闡述方法純化之重組I2S蛋白質呈現與使用標準方法純化之I2S參照樣品相比相當之條帶型式。

肽圖譜

使用上文所闡述方法純化由I2S-AF 2D細胞系產生之重組I2S蛋白質。使經純化重組I2S以及參照人類I2S之樣品各自經受蛋白水解消化，並藉由HPLC分析進行檢查。與參照I2S相比之實例性肽圖譜係顯示於圖9中。

甲醯甘胺酸轉化百分比

可使用肽映射測定FGly轉化百分比。I2S活化要求半胱胺酸(與成熟人類I2S之59位相對應)藉由甲醯甘胺酸生成酶(FGE)轉化至甲醯甘胺酸，如下文所顯示：



因此，可使用下式計算甲醯甘胺酸轉化百分比(%FG)：

$$\% \text{FG (DS)} = \frac{\text{活性 I2S 分子數}}{\text{總(活性+非活性) I2S 分子數}} \times 100$$

例如50% FG意指一半經純化重組I2S無酶活性，且無任何治療效應。

使用肽映射計算%FG。簡言之，使用蛋白酶(例如，胰蛋白酶或

胰凝乳蛋白酶)將經純化重組I2S蛋白質消化成短肽。使用HPLC分離並表徵短肽。表徵含有與成熟人類I2S之59位相對應之位置之肽，以確定與對照(例如，無FGly轉化之I2S蛋白質或具有100% FGly轉化之I2S蛋白質)相比59位處之Cys是否轉化成FGly。基於相應峰面積測定含有FGly之肽之量(與活性I2S分子數相對應)及含有FGly及Cys二者之肽之總量(與總I2S分子數相對應)，且可計算反映%FG之比率。實例性結果係顯示於表14中。

聚糖圖譜-甘露醇-6-磷酸鹽及唾液酸含量

測定經純化重組I2S蛋白質之聚糖及唾液酸組成。使用陰離子交換層析法實施聚糖組合物之量化，以產生聚糖圖譜。如下文所闡述，在本文中所闡述之條件下純化之重組I2S之聚糖圖譜係由7個峰群組組成，根據漸增量之負電荷溶析，該等負電荷至少部分源於由酶消化產生之唾液酸及甘露醇-6-磷酸鹽糖型。簡言之，利用以下酶處理來自無血清細胞培養物(無血清I2S-AF 2D及無血清I2S-AF 4D)之經純化重組I2S及參照重組I2S：(1) 經純化神經胺酸酶(自產脲關節桿菌(*Arthrobacter Ureafaciens*，10 mU/ μ L)分離，Roche Biochemical (Indianapolis, IN)，目錄編號269 611 (1U/100 μ L))，用於去除唾液酸殘基，(2) 鹼性磷酸酶，在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下處理2小時，用於完全釋放甘露醇-6-磷酸鹽殘基，(3) 鹼性磷酸酶+神經胺酸酶，或(4) 無處理。藉由利用脈衝電流檢測(HPAE-PAD)並使用配備有Dionex CarboPac PA1保護管柱之CarboPac PA1分析管柱進行高效陰離子交換層析法來分析每一次酶消化。對於每一分析，運行一系列在0.4奈莫耳至2.0奈莫耳範圍內之唾液酸及甘露醇-6-磷酸鹽標準物。在環境管柱溫度下以1.0 mL/min之流速將用存於100 mM氫氧化鈉中之48 mM乙酸鈉之等度方法運行最少15分鐘，以溶析每一峰。針對I2S-AF及參照I2S樣品二者，將自每一個別試驗生成之數據各自合併成單一層析圖，以代表每

一各別重組蛋白質之聚糖圖譜。如圖10中所指示，自無血清培養基純化之I2S之聚糖圖譜顯示構成中性、經單唾液酸基化、經二唾液酸基化、經單磷酸基化、經三唾液酸基化及混合(經單唾液酸基化且經甘露醇-6-磷酸鹽封端)、經四唾液酸基化及混合(經二唾液酸基化且經甘露醇-6-磷酸鹽封端)及經二磷酸化之聚糖之代表性溶析峰(按溶析之次序)。實例性聚糖圖譜係顯示於圖10中。

自唾液酸標準物之線性回歸分析計算每一重組I2S樣品中之平均唾液酸含量(莫耳唾液酸/莫耳蛋白質)。使用PeakNet 6軟體使每一層析試驗可視化。唾液酸標準物及自重組I2S分析對照及測試樣品釋放之唾液酸呈現為單一峰。使用以下等式將I2S之唾液酸(奈莫耳)之量計算為原始值：

$$S.A.(\text{莫耳/莫耳 I2S}) = \frac{(\text{唾液酸奈莫耳數})}{(0.3272)(C)}$$

其中C為樣品或重組I2S分析對照之蛋白質濃度(in mg/ml)。

使用下式將每一測試樣品之唾液酸之校正值計算為唾液酸莫耳/蛋白質莫耳：

$$\text{校正 S.A} = \frac{(\text{樣品原始唾液酸值}) \times (\text{確定之艾杜硫酶分析對照值})}{(\text{艾杜硫酶分析對照原始唾液酸值})}$$

指示自I2S-AF 2D或4D細胞系純化之重組I2S上之唾液酸含量的實例性數據係顯示於表14中。

表14：自無血清細胞培養物純化之I2S之實例性特徵

分析	I2S-AF 2D (血清-free)
肽映射	
L1	101
L10	100
L12	102
L13	97

L14	101
L17	100
L20	102
宿主細胞蛋白質	<62.5 ng/mg
離子交換HPLC面積%	
峰A	62
峰A+B	82
峰E+F	0
甲醯甘胺酸%	87
特異性活性 (U/mg) (硫酸根釋放分析)	64
粒徑排阻HPLC%	≥99.8 (n=13)
聚糖映射	
經單唾液酸基化	105
經二唾液酸基化	93
經單磷酸基化	139
經三唾液酸基化	89
經四唾液酸基化	125
經二磷酸基化	95
唾液酸(mol/mol)	20

特異性活性

使用活體外硫酸根釋放分析或4-MUF分析來分析使用上文所闡述方法純化之重組I2S酶之特異性活性。

活體外硫酸根釋放分析

使用肝素雙糖作為受質實施活體外硫酸根釋放活性分析。特定而言，此分析量測I2S自天然來源之受質肝素二糖釋放硫酸根離子之能力。可藉由配備有導電率檢測器之離子層析法量化所釋放之硫酸根。簡言之，首先將樣品緩衝交換至10 mM乙酸鈉(pH 6)，以消除調

配物緩衝液中之磷酸根離子所造成之抑制。然後利用反應緩衝液(10 mM乙酸鈉, pH 4.4)將樣品稀釋至0.075 mg/ml, 並在37°C下以30 µL反應體積中0.3 µg I2S/100 µg受質之酶對受質比率與肝素雙糖一起培育2 hr。然後藉由在100°C下將樣品加熱3 min來終止該反應。使用具有IonPac AG18保護管柱之Dionex IonPac AS18分析管柱實施該分析。利用30 mM氫氧化鉀以1.0 mL/min使用等度方法, 並持續15分鐘。自在1.7奈莫耳至16.0奈莫耳範圍內之硫酸根標準物之線性回歸分析計算由I2S樣品釋放之硫酸根之量。可報告值係表示為單位/mg蛋白質, 其中1單位係定義為每小時釋放之1 µmole硫酸根, 且蛋白質濃度係藉由A280量測來測定。實例性結果係顯示於表14中。

4-MUF分析

亦可使用基於螢光之4-MUF分析來分析經純化重組I2S酶之特異性活性。簡言之, 該分析量測I2S受質4-甲基傘形酮基-硫酸酯(4-MUF-SO₄)之水解。在4-MUF-SO₄受質由I2S裂解後, 將該分子轉化成硫酸鹽及天然螢光4-甲基傘形酮(4-MUF)。因此, 可藉由評價螢光信號隨時間之總變化來測定I2S酶活性。對於此實驗, 將經純化I2S酶與4-甲基傘形酮基-硫酸酯(4-MUF-SO₄), Potassium Salt, Sigma目錄編號M-7133)之溶液一起培育。使用一系列對照參照樣品並使用以儲備溶液之1:100、1:200及1:20,000稀釋之市售I2S酶實施該分析之校準。在37°C下運行酶分析, 並使用經校準螢光計分析。使用針對每一參照標準物所獲得之螢光值, 使用以下等式測定變異係數百分比:

$$\%CV = \frac{\text{原始螢光值之標準偏差}(N=3)}{\text{平均螢光值}} \times 100\%$$

然後使用%CV值計算每一樣品之校正平均螢光, 以使用下式測定可報告活性, 以mU/mL表示:

$$mU/mL = (CFU) \left(\frac{1 \text{ 奈莫耳/L}}{10 \text{ FU}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \right) \left(\frac{2.11 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ 小時}}{60 \text{ min}} \right) \left(\frac{1 \text{ mU}}{\text{奈莫耳}} \right) (DF)$$

CFU = 負校正平均螢光

DF - 稀釋因子

1毫單位之活性係在37℃下於1分鐘內將1奈莫耳之4-甲基傘形酮基-硫酸酯轉化成4-甲基傘形酮所需要之酶之量。

電荷剖面

對於此實驗，藉由強陰離子交換(SAX)層析法利用高效液體層析法(HPLC)系統測定每一經純化重組I2S之電荷分佈。該方法基於表面電荷差異分離該樣品內之重組I2S變體。在pH 8.00下，帶負電荷之種類吸附至SAX管柱之固定正電荷上。使用漸增離子強度之梯度來隨蛋白質種類與該管柱之離子相互作用之強度而成比例地溶析每一蛋白質種類。將100微克在無血清生長條件下自2D細胞系分離之經純化I2S或參照重組I2S酶裝載至保持在室溫下並平衡至20 mM Tris-HCl (pH 8.00)之Amersham Biosciences Mini Q PE (4.6×50 mm)管柱上。以0.80 mL/min之流速使用20 mM Tris-HCl、1.0 M氯化鈉(pH 8.00)之流動相進行梯度溶析。在運行期間藉由在280 nm波長下量測樣品溶析之光吸光度來連續測定蛋白質濃度。顯示針對自2D及4D細胞系純化之重組I2S所獲得之電荷剖面之實例性結果係顯示於圖11中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商舒爾人類基因療法公司

<120> 艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶之純化

<130> 2006685-0140TW

<150> 61/666,733

<151> 2012-06-29

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 525

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
20 25 30

Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
35 40 45

Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val
50 55 60

Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
65 70 75 80

Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
85 90 95

Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
100 105 110

His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
115 120 125

Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
130 135 140

Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
145 150 155 160

Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser
165 170 175

Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser
180 185 190

Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg
195 200 205

Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu

210	215	220
Ala Pro Asp Pro Glu Val 225	Pro Asp Gly Leu 230	Pro Pro Val Ala Tyr Asn 235 240
Pro Trp Met Asp Ile 245	Arg Gln Arg Glu Asp 250	Val Gln Ala Leu Asn Ile 255
Ser Val Pro Tyr Gly 260	Pro Ile Pro Val Asp 265	Phe Gln Arg Lys Ile Arg 270
Gln Ser Tyr Phe Ala 275	Ser Val Ser Tyr Leu Asp 280	Thr Gln Val Gly Arg 285
Leu Leu Ser Ala Leu Asp 290	Asp Leu Gln Leu Ala 295	Asn Ser Thr Ile Ile 300
Ala Phe Thr Ser Asp 305	His Gly Trp Ala Leu 310	Gly Glu His Gly Glu Trp 315 320
Ala Lys Tyr Ser Asn 325	Phe Asp Val Ala Thr 330	His Val Pro Leu Ile Phe 335
Tyr Val Pro Gly Arg 340	Thr Ala Ser Leu Pro 345	Glu Ala Gly Glu Lys Leu 350
Phe Pro Tyr Leu Asp 355	Pro Phe Asp Ser Ala 360	Ser Gln Leu Met Glu Pro 365
Gly Arg Gln Ser Met 370	Asp Leu Val Glu Leu 375	Val Ser Leu Phe Pro Thr 380
Leu Ala Gly Leu Ala 385	Gly Leu Gln Val Pro 390	Pro Arg Cys Pro Val Pro 395 400
Ser Phe His Val Glu 405	Leu Cys Arg Glu Gly 410	Lys Asn Leu Leu Lys His 415
Phe Arg Phe Arg Asp 420	Leu Glu Glu Asp 425	Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro 430
Arg Glu Leu Ile Ala 435	Tyr Ser Gln Tyr Pro 440	Arg Pro Ser Asp Ile Pro 445
Gln Trp Asn Ser Asp 450	Lys Pro Ser Leu Lys 455	Asp Ile Lys Ile Met Gly 460
Tyr Ser Ile Arg Thr 465	Ile Asp Tyr Arg Tyr 470	Thr Val Trp Val Gly Phe 475 480
Asn Pro Asp Glu Phe 485	Leu Ala Asn Phe Ser 490	Asp Ile His Ala Gly Glu 495
Leu Tyr Phe Val Asp 500	Ser Asp Pro Leu Gln 505	Asp His Asn Met Tyr Asn 510

Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro
 515 520 525

<210> 2
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
 20 25 30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
 35 40 45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
 50 55 60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
 65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
 85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
 100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
 115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
 130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
 145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
 165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
 180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
 195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
 210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
 225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
 245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
 260 265 270
 Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
 275 280 285
 Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val
 290 295 300
 Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
 325 330 335
 Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp
 340 345 350
 Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala
 355 360 365
 Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe
 370 375 380
 Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu
 385 390 395 400
 Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu
 405 410 415
 Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys
 420 425 430
 Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu
 435 440 445
 Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser
 450 455 460
 Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp
 485 490 495
 Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala
 500 505 510
 Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp
 515 520 525
 Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu
 530 535 540
 Phe Gln Leu Leu Met Pro
 545 550

<210> 3
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
 20 25 30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
 35 40 45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
 50 55 60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
 65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
 85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
 100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
 115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
 130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
 145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
 165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
 180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
 195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
 210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
 225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
 245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
 260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
275 280 285

Pro Val Asp Phe Gln Glu Asp Gln Ser Ser Thr Gly Phe Arg Leu Lys
290 295 300

Thr Ser Ser Thr Arg Lys Tyr Lys
305 310

<210> 4
<211> 343
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
20 25 30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
35 40 45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
50 55 60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
275 280 285

Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val
290 295 300

Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp
305 310 315 320

Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
325 330 335

Phe Leu Met Arg Thr Asn Thr
340

<210> 5
<211> 374
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Val Cys Gly Arg Cys Pro Glu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Cys Gly Ala Ala
20 25 30

Gly Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly
35 40 45

Ser Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser
50 55 60

Ala Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val
65 70 75 80

Pro Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala
85 90 95

Gly Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly
100 105 110

Glu Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala
115 120 125

Tyr Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly
130 135 140

Tyr Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly
145 150 155 160

Met Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala
165 170 175

Ala Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu
180 185 190

Gly Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His
195 200 205

Val Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg
210 215 220

Leu Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His
225 230 235 240

Asn Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His
245 250 255

Tyr Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu
260 265 270

Asp Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly
275 280 285

Tyr Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp
290 295 300

Trp Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly
305 310 315 320

Pro Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys
325 330 335

His Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn
340 345 350

Thr Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp
355 360 365

Arg Leu Pro Thr Met Asp
370

申請專利範圍

1. 一種組合物，其包含具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列之經純化重組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)，
其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約70%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)，且
進一步其中該經純化重組I2S含有少於150 ng/mg宿主細胞蛋白(HCP)。
2. 如請求項1之組合物，其中該經純化重組I2S含有少於100 ng/mg HCP。
3. 如請求項1之組合物，其中該經純化重組I2S含有少於80 ng/mg HCP。
4. 如請求項1之組合物，其中該經純化重組I2S含有少於60 ng/mg HCP。
5. 一種組合物，其包含具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列之經純化重組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)，
其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約70%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)，且
進一步其中該經純化重組I2S平均含有每分子至少16個唾液酸。
6. 如請求項5之組合物，其中該經純化重組I2S平均含有每分子至少18個唾液酸。
7. 如請求項5之組合物，其中該經純化重組I2S平均含有每分子至少20個唾液酸。
8. 一種組合物，其包含具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列之經純化重組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)，

其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約70%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)，且

進一步其中該經純化重組I2S含有每個酶至少10%雙磷酸化寡糖。

9. 如請求項8之組合物，其中該經純化重組I2S含有每個酶至少20%雙磷酸化寡糖。

10. 一種組合物，其包含具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列之經純化重組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)，

其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約70%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)，且

進一步其中該經純化I2S之特徵在於其聚糖圖譜包含7個或更少個峰群組，該等峰群組選自指示中性(峰群組1)、經單唾液酸基化(峰群組2)、經二唾液酸基化(峰群組3)、經單磷酸化(峰群組4)、經三唾液酸基化(峰群組5)、經四唾液酸基化(峰群組6)或經二磷酸化(峰群組7)之I2S蛋白質之峰群組。

11. 如請求項1至10中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約75%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。

12. 如請求項1至10中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基至少約80%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。

13. 一種組合物，其包含具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列之經純化重組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基超過約85%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。

14. 如請求項13之組合物，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID

NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基超過約90%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。

15. 如請求項13之組合物，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基超過約95%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。
16. 如請求項13之組合物，其中該經純化重組I2S中對應於SEQ ID NO:1之Cys59之半胱胺酸殘基實質上100%轉化成C α -甲醯甘胺酸(FGly)。
17. 如請求項1至10及13至16中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S具有與SEQ ID NO:1具有至少80%一致性之胺基酸序列。
18. 如請求項1至10及13至16中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S具有與SEQ ID NO:1具有至少90%一致性之胺基酸序列。
19. 如請求項1至10及13至16中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S具有與SEQ ID NO:1具有至少95%一致性之胺基酸序列。
20. 如請求項1至10及13至16中任一項之組合物，其中該經純化重組I2S具有與SEQ ID NO:1一致之胺基酸序列。
21. 一種調配物，其包含如請求項1至20中任一項之組合物及生理上可接受之載體。
22. 如請求項21之調配物，其中該調配物適於靜脈內投藥。
23. 如請求項21之調配物，其中該調配物適於鞘內投藥。
24. 如請求項21之調配物，其中該調配物適於皮下投藥。
25. 如請求項21之調配物，其中該調配物係用於治療韓特氏症候群(Hunter syndrome)。
26. 一種方法，其包含

藉由實施陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析法中之一或多者，自不純製劑中純化重組

組艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)蛋白質，且

其中該方法涉及少於6個層析步驟且其中該經純化重組I2S蛋白質含有少於100 ng/mg宿主細胞蛋白(HCP)。

27. 如請求項26之方法，其中該陰離子交換層析法係Q層析法。
28. 如請求項26或27之方法，其中該陽離子交換層析法係SP層析法。
29. 如請求項26或27之方法，其中該混合模式層析法係羧磷灰石(HA)層析法。
30. 如請求項26或27之方法，其中該疏水作用層析法係苯基層析法。
31. 如請求項26或27之方法，其中該方法涉及5個或更少個層析步驟。
32. 如請求項26或27之方法，其中該方法涉及4個或更少個層析步驟。
33. 如請求項26或27之方法，其中該方法係以該陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析法之順序進行。
34. 如請求項26或27之方法，其中該陰離子交換層析管柱一旦裝載有該不純製劑或中間析出液時，即使用包含濃度約140 mM至200 mM之間範圍內之NaCl且具有pH 5.5之洗滌緩衝液洗滌。
35. 如請求項26或27之方法，其中使用包含線性NaCl梯度之溶析緩衝液溶析該陰離子交換層析管柱。
36. 如請求項35之方法，其中該線性NaCl梯度包含0 mM至500 mM範圍之NaCl。
37. 如請求項26或27之方法，其中該不純製劑或中間析出液在裝載至該陽離子交換層析管柱之前，先將導電率調整至約1 mS/cm至

20 mS/cm之間範圍內。

38. 如請求項37之方法，其中該陽離子交換層析管柱係在約5.5之pH下運行。
39. 如請求項26或27之方法，其中該不純製劑或中間析出液在裝載至該混合模式層析管柱之前，先調整至磷酸鹽濃度約0.001 M至0.01 M之範圍內及pH 5.5。
40. 如請求項39之方法，其中一旦裝載該混合模式層析管柱時，即使用包含約10 mM至20 mM之間範圍內之磷酸鹽濃度且pH 5.5之洗滌緩衝液洗滌。
41. 如請求項40之方法，其中使用包含約50 mM至150 mM之間範圍內之磷酸鹽濃度且pH 5.5之溶析緩衝液溶析該混合模式層析管柱。
42. 如請求項26或27之方法，其中該不純製劑或中間析出液在裝載至該疏水作用層析管柱之前，先調整至約0.5 M至2.0 M之範圍內之鹽濃度及約4.5至6.0之pH。
43. 如請求項42之方法，其中一旦裝載該疏水作用層析管柱時，即使用包含約0.5 M至2.0 M之間範圍內之鹽濃度且pH為約4.5至6.0之洗滌緩衝液洗滌。
44. 如請求項43之方法，其中使用包含約0.1 M至0.5 M之間之範圍內之鹽濃度且pH為約4.5至6.0之溶析緩衝液溶析該疏水作用層析管柱。
45. 如請求項26或27之方法，其中該陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、混合模式層析法及疏水作用層析管柱分別具有14 cm至25 cm之範圍內之高度。
46. 如請求項26或27之方法，其中該方法進一步包含使病毒失活之步驟。

47. 如請求項46之方法，其中該病毒失活步驟係在該不純製劑裝載至第一層析管柱之前。
48. 如請求項46之方法，其中該病毒失活步驟包括將清潔劑添加至該不純製劑中。
49. 如請求項26或27之方法，其中該方法進一步包括在最後一個層析管柱之後去除病毒之步驟。
50. 如請求項26或27之方法，其中該方法進一步包括超濾及/或滲濾之步驟。
51. 如請求項50之方法，其中該超濾及/或滲濾步驟包括將該經純化重組I2S蛋白質交換至藥物調配物緩衝液中。
52. 如請求項26或27之方法，其中該重組I2S蛋白質具有與SEQ ID NO:1具有至少70%一致性之胺基酸序列。
53. 如請求項26或27之方法，其中該重組I2S蛋白質具有與SEQ ID NO:1一致之胺基酸序列。
54. 如請求項26或27之方法，其中該重組I2S蛋白質係由在無血清培養基中懸浮培養之哺乳動物細胞產生。
55. 如請求項54之方法，其中在生物反應器中培養該等哺乳動物細胞。
56. 如請求項54之方法，其中該無血清培養基缺少動物源性組份。
57. 如請求項54之方法，其中該無血清培養基係化學配方培養基。
58. 如請求項54之方法，其中該等哺乳動物細胞共同表現該重組I2S蛋白質及甲醯甘胺酸生成酶(FGE)。
59. 如請求項58之方法，其中該等哺乳動物細胞係人類細胞。
60. 如請求項54之方法，其中該不純製劑係自含有該等哺乳動物細胞所分泌之重組I2S蛋白質之無血清培養基製備。
61. 如請求項60之方法，其中該不純製劑係自冷凍培養基製劑解

凍。

62. 如請求項26或27之方法，其中該經純化重組I2S蛋白質含有少於80 ng/mg HCP。
63. 如請求項26或27之方法，其中該經純化重組I2S蛋白質含有少於60 ng/mg HCP。
64. 如請求項26或27之方法，其中該經純化重組I2S蛋白質平均含有每分子16個至22個唾液酸。
65. 如請求項26或27之方法，其中如藉由使用肝素雙糖作為受質之活體外硫酸根釋放活性分析法所測定，該經純化重組I2S蛋白質具有至少60 U/mg之特異性活性。
66. 一種醫藥組合物，其包含根據如請求項26至65中任一項之方法所純化之重組I2S蛋白質。
67. 一種根據如請求項26至65中任一項之方法所純化之重組I2S蛋白質之用途，其用於製造用以治療韓特氏症候群(Hunter syndrome)之醫藥。

圖式

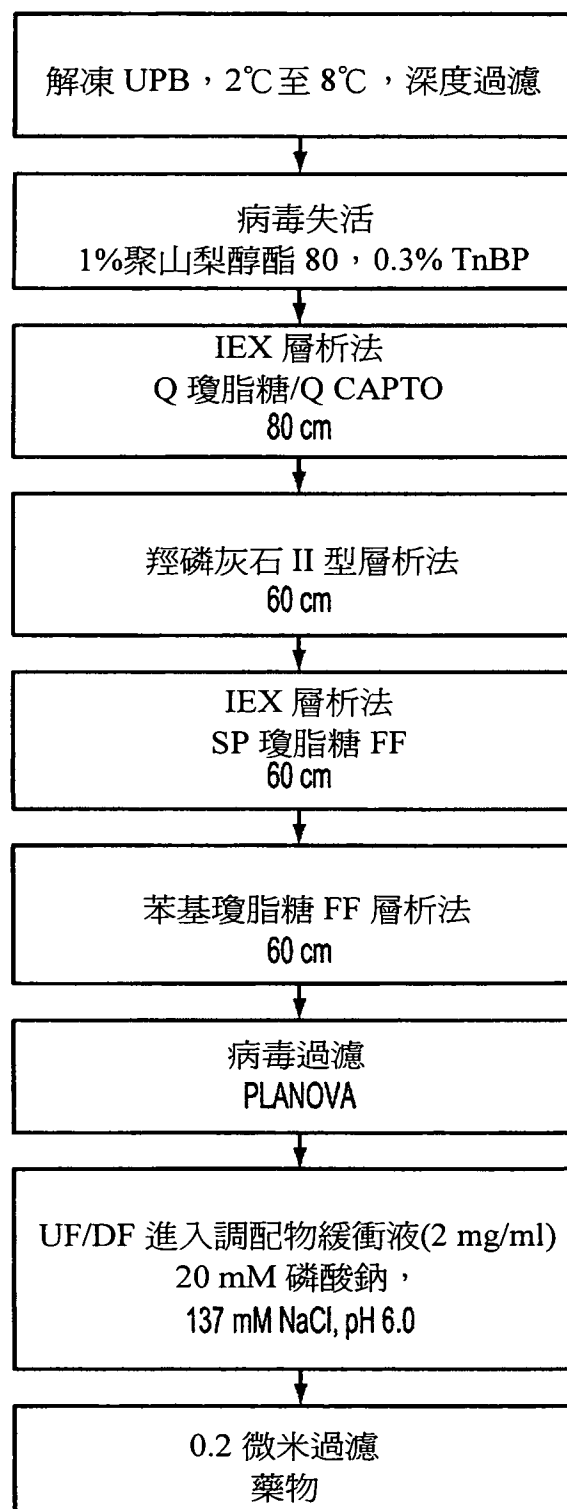


圖 1

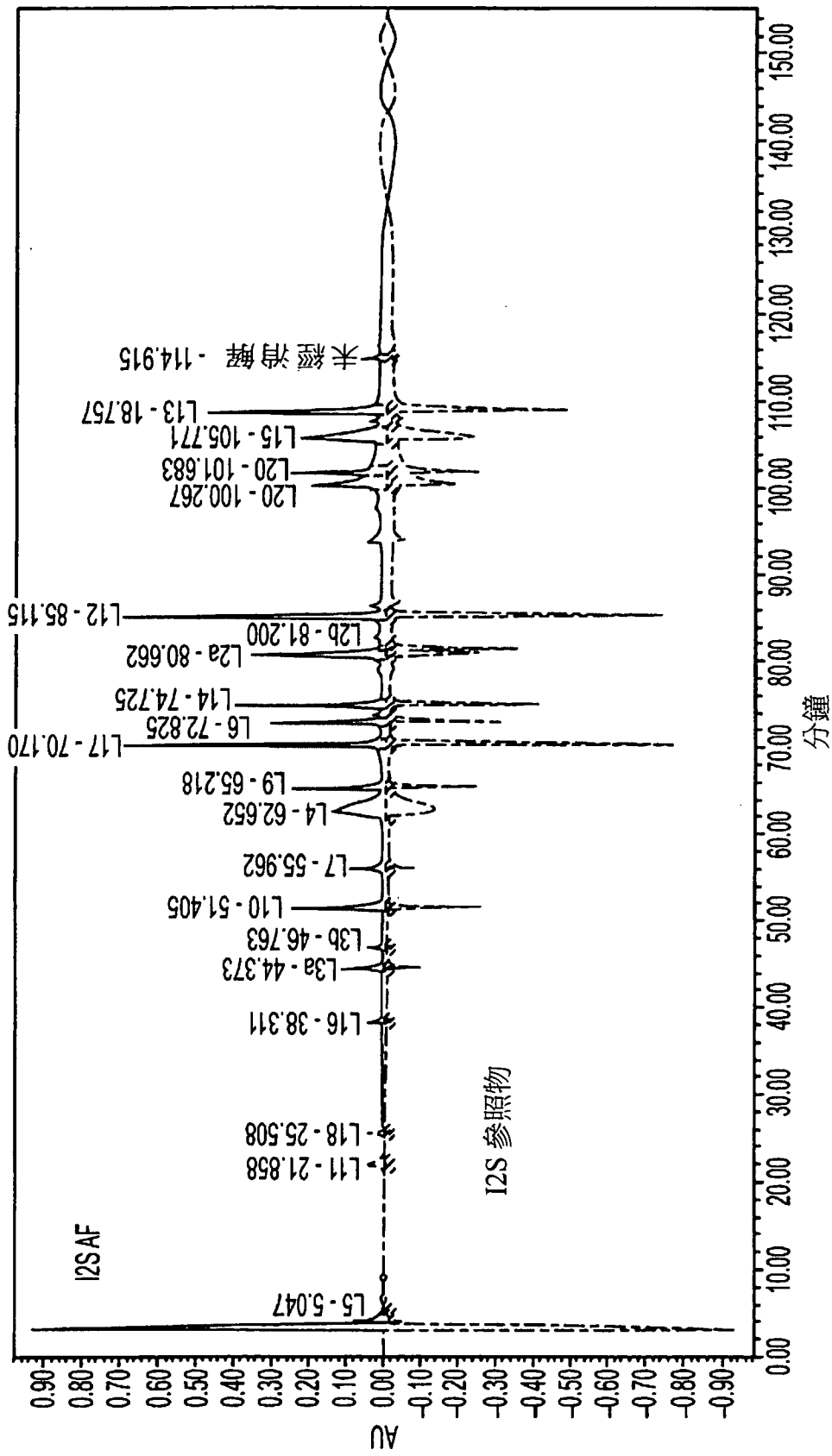
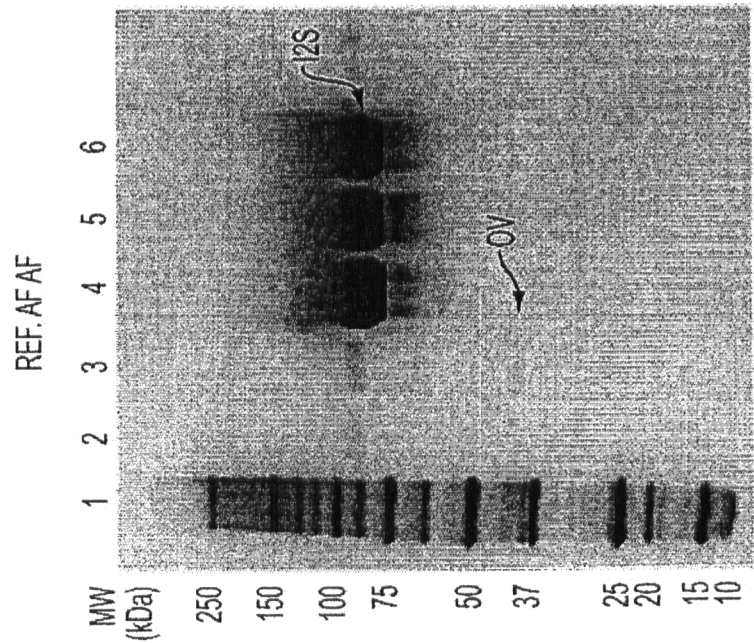


圖 2



帶	裝載樣品	PAD ID	裝載體積 μl	總 μg
1	PRECISION PLUS 蛋白質標準物(未經染色)		3 μl	
2	分析對照 1 號		20	各 8 μg OV END REF
3	分析對照 2 號		20	各 18 μg OV END REF
4	參照標準物		20	8
5	RDSF 11-101 模擬 DS	11AD0545-1	20	8
6	RDSF 11-105 模擬 DS	11AD0545-2	20	8

圖 3

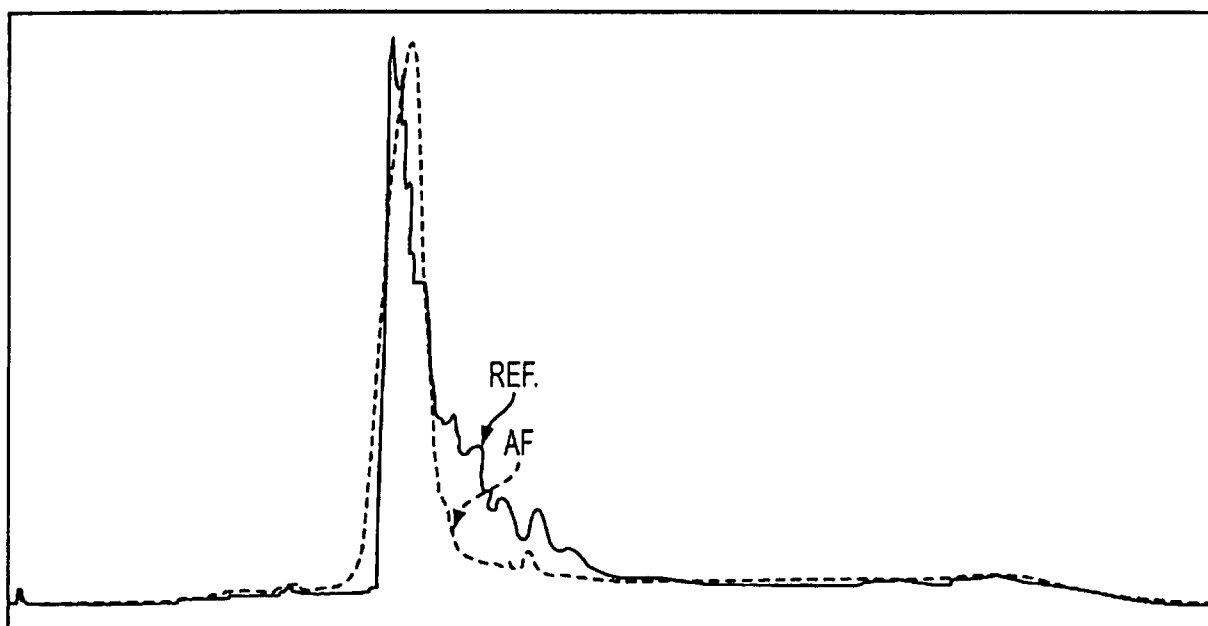


圖 4

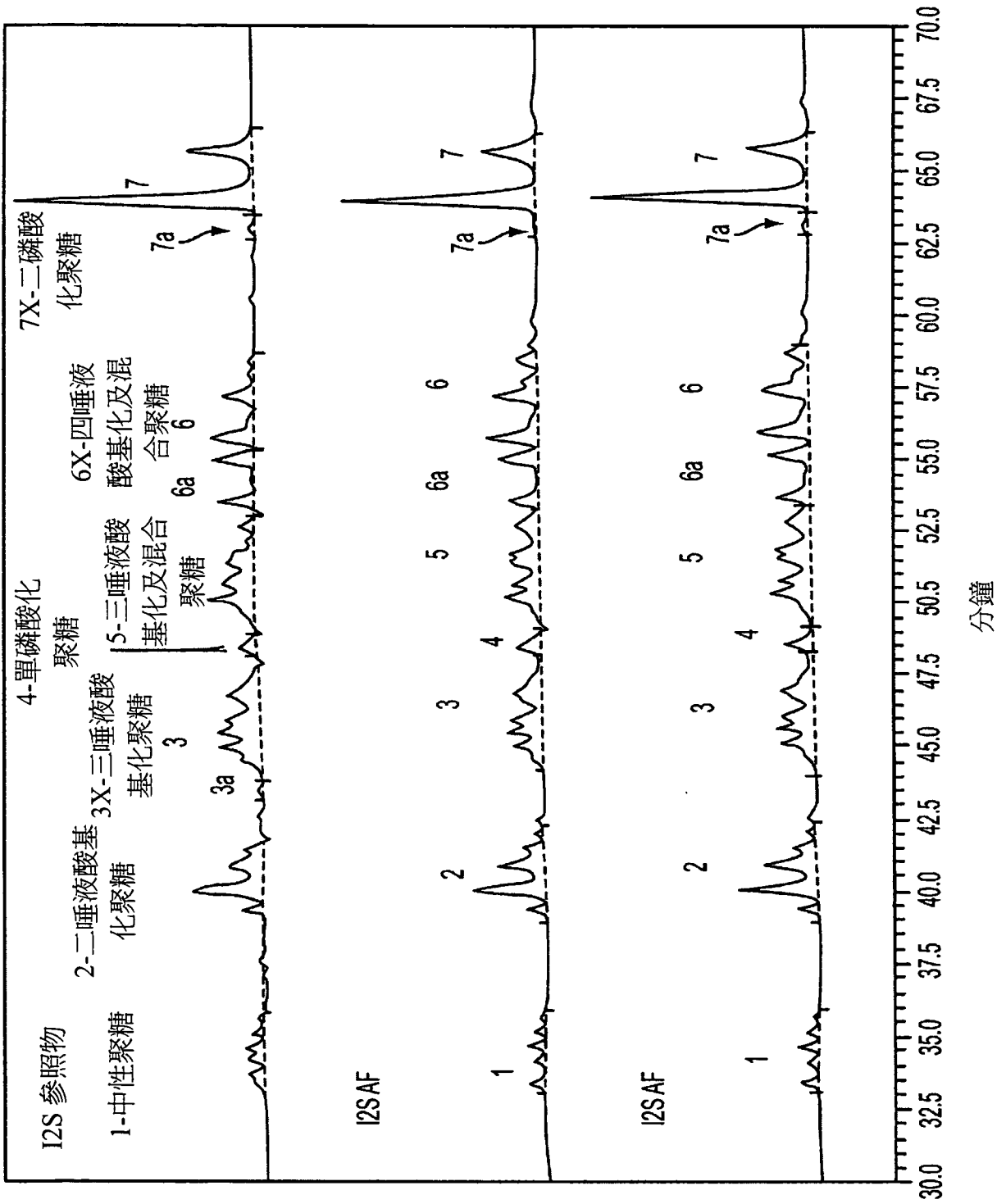


圖 5

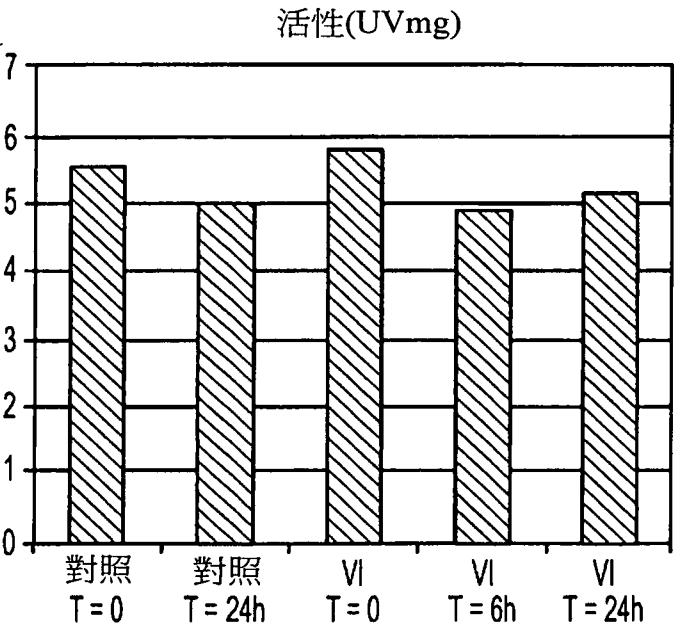


圖 6

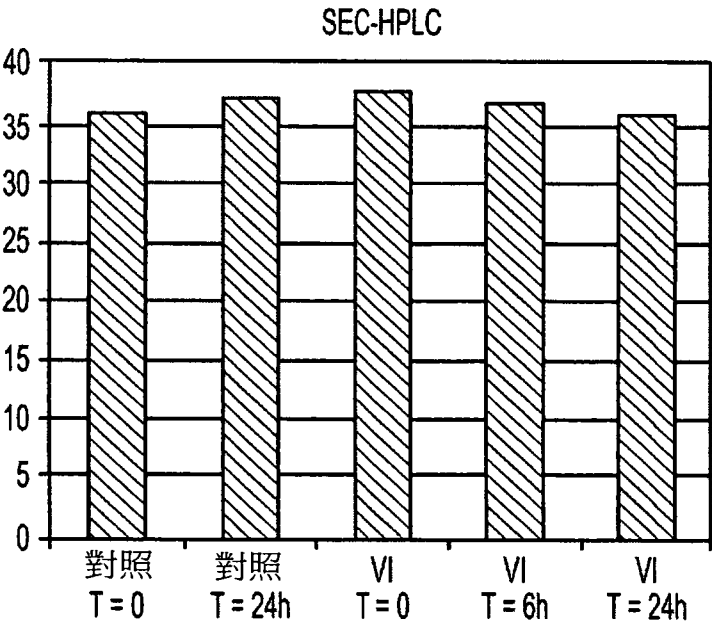
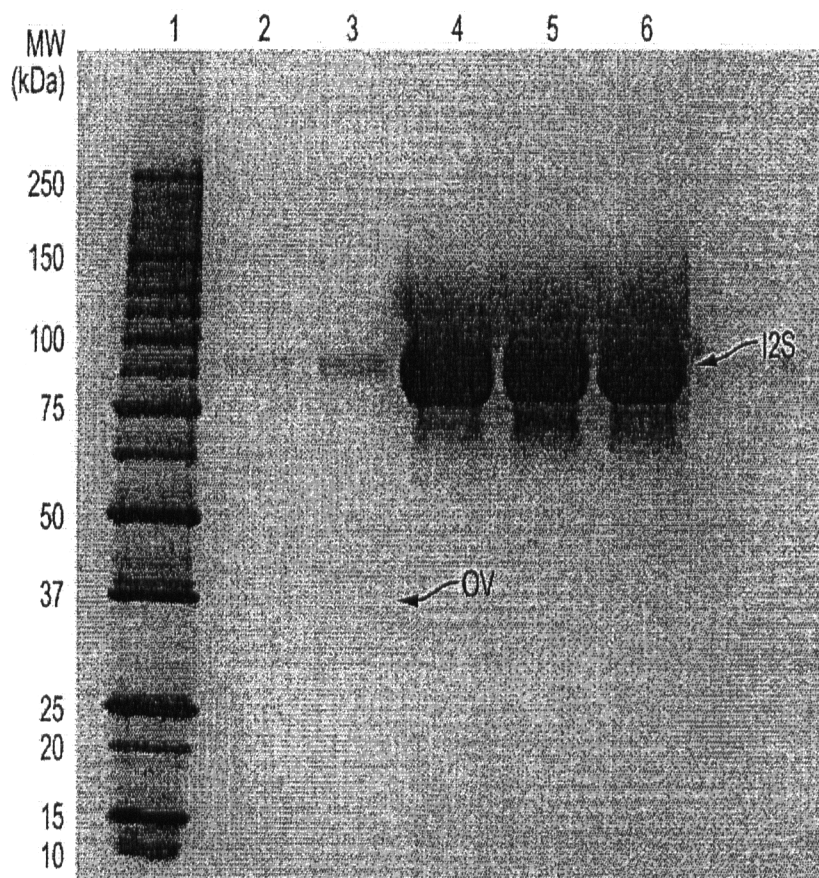


圖 7



帶	裝載樣品	裝載體積	總 μg
1	蛋白質標準物	3 μl	
2	分析對照 1 號	20 μl	8 μg
3	分析對照 2 號	20 μl	16 μg
4	I2S 參照標準物	20 μl	8 μg
5	I2S-AF 2D 無血清培養物	20 μl	8 μg
6	I2S-AF 4D 無血清培養物	20 μl	8 μg

圖 8

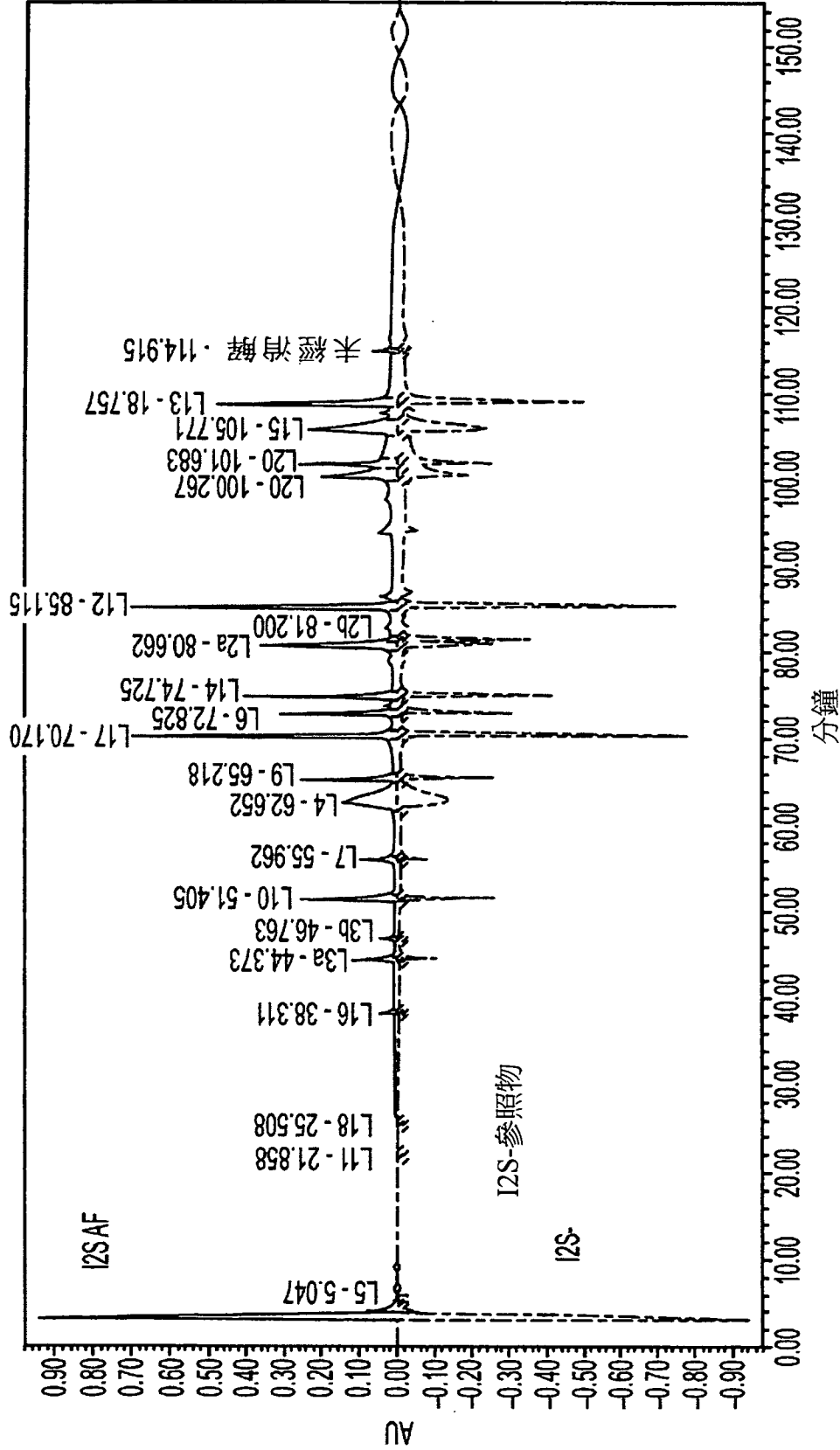


圖 9

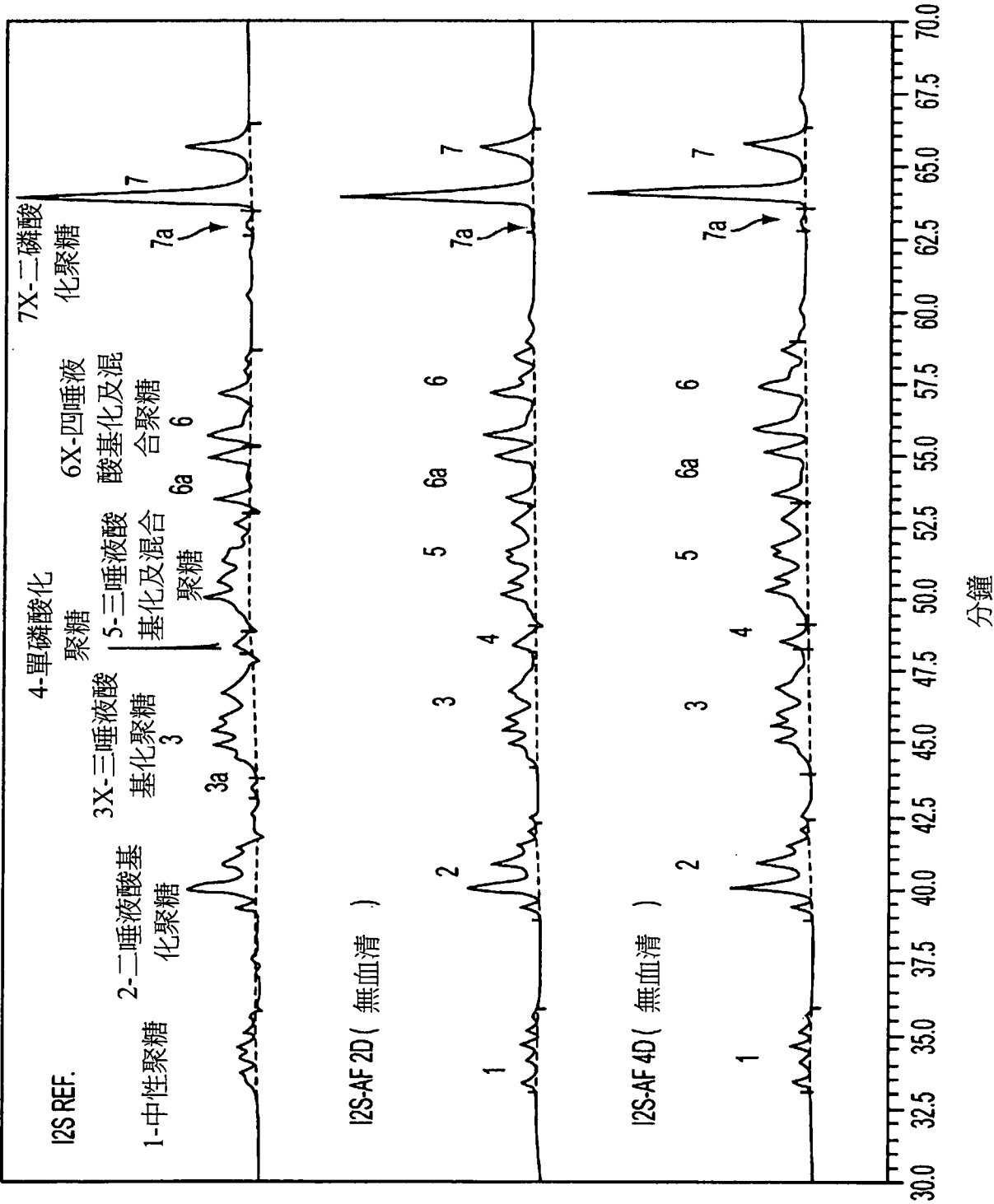


圖 10

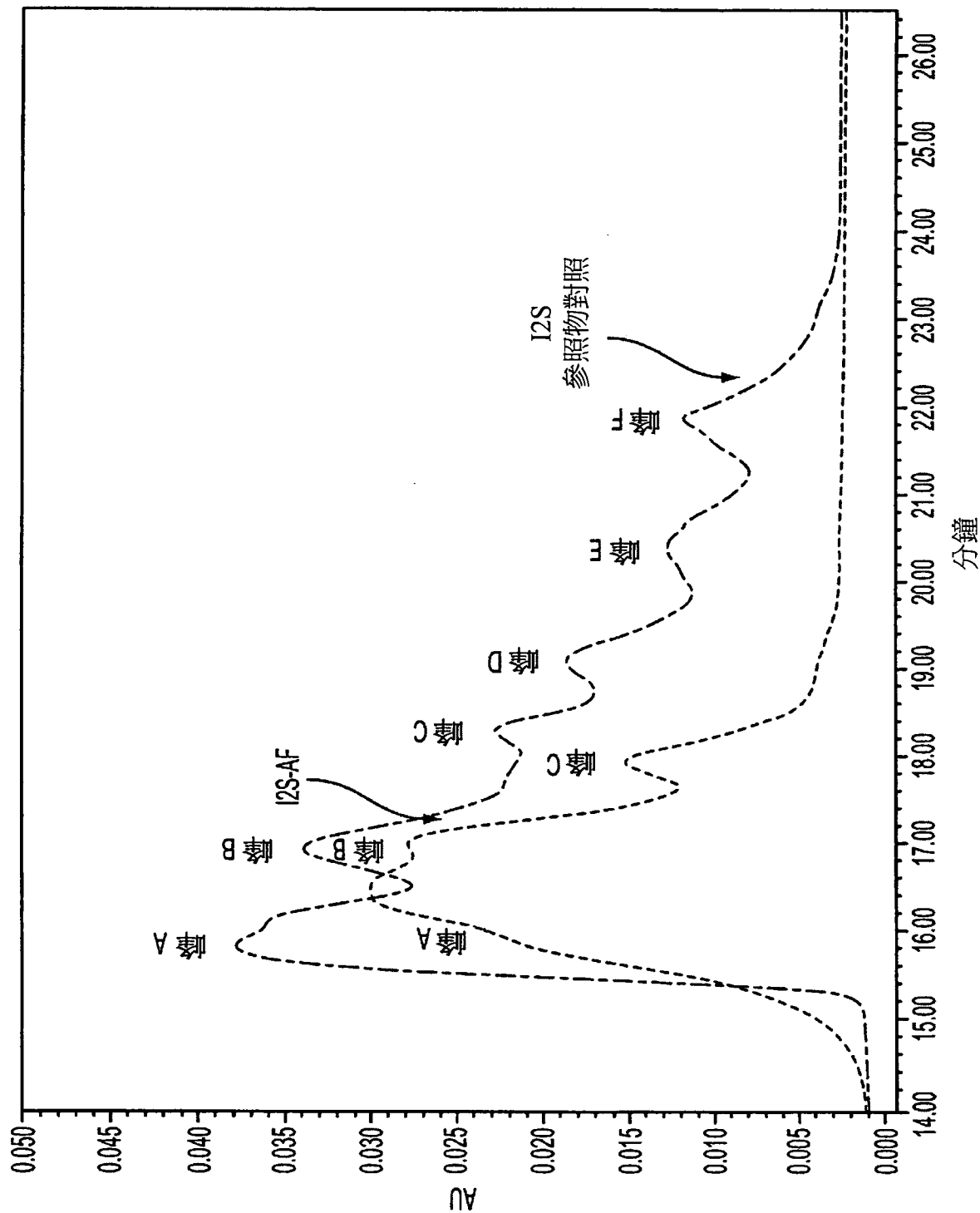


圖 11

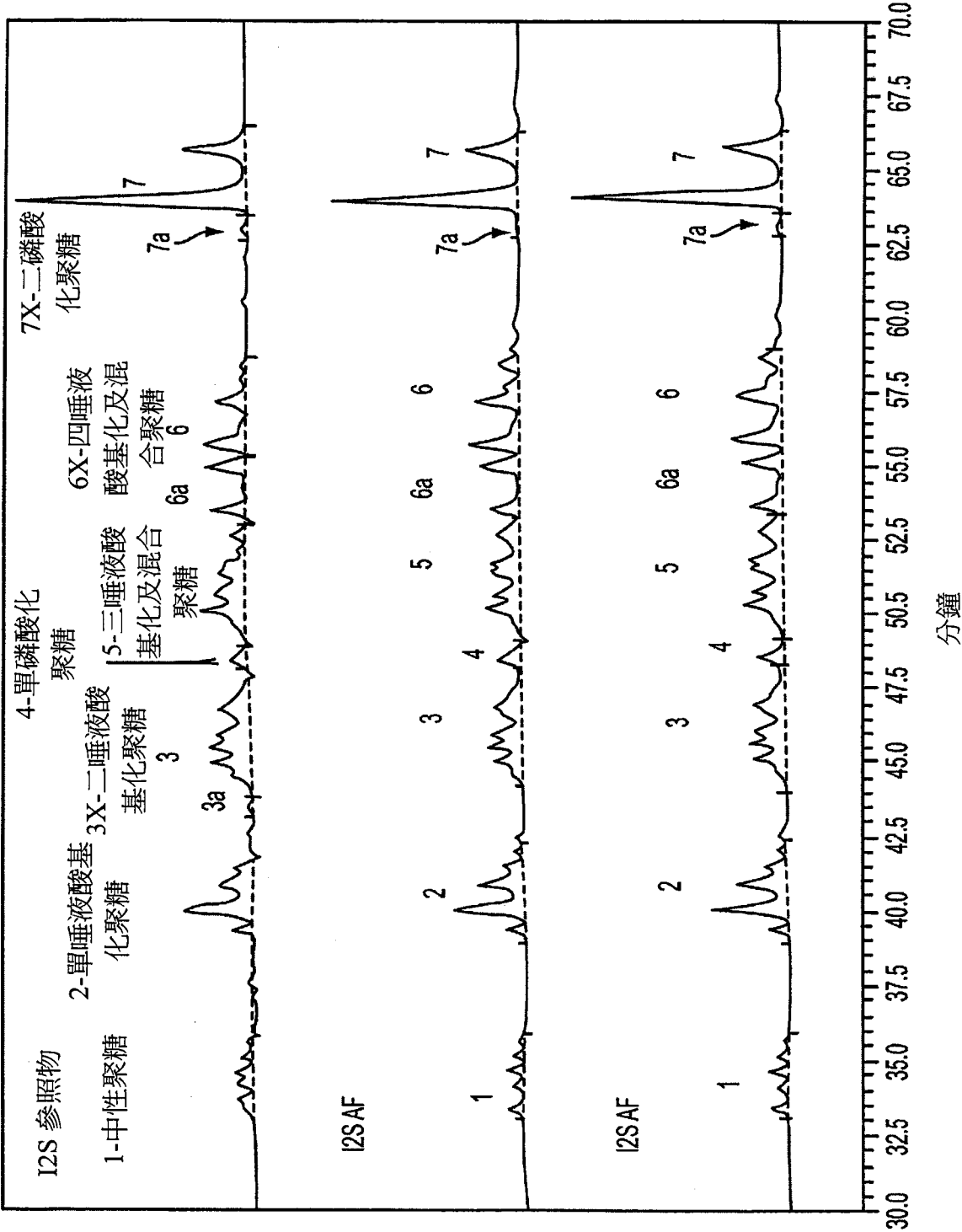


圖 5

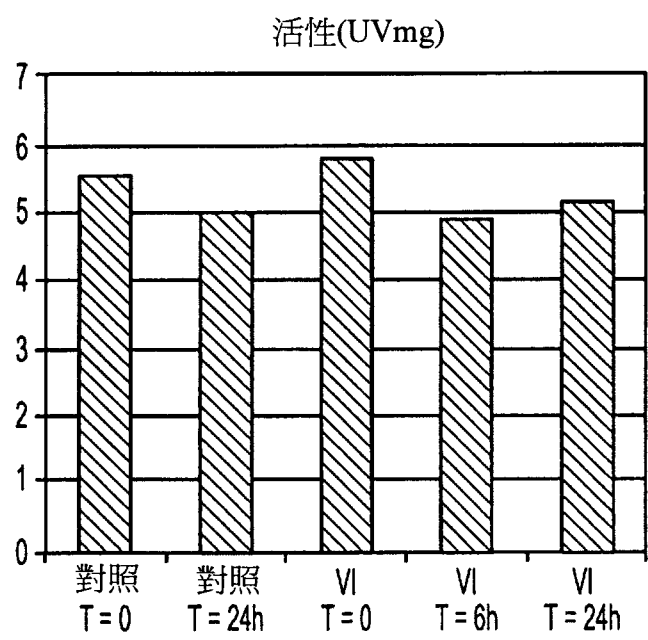


圖 6

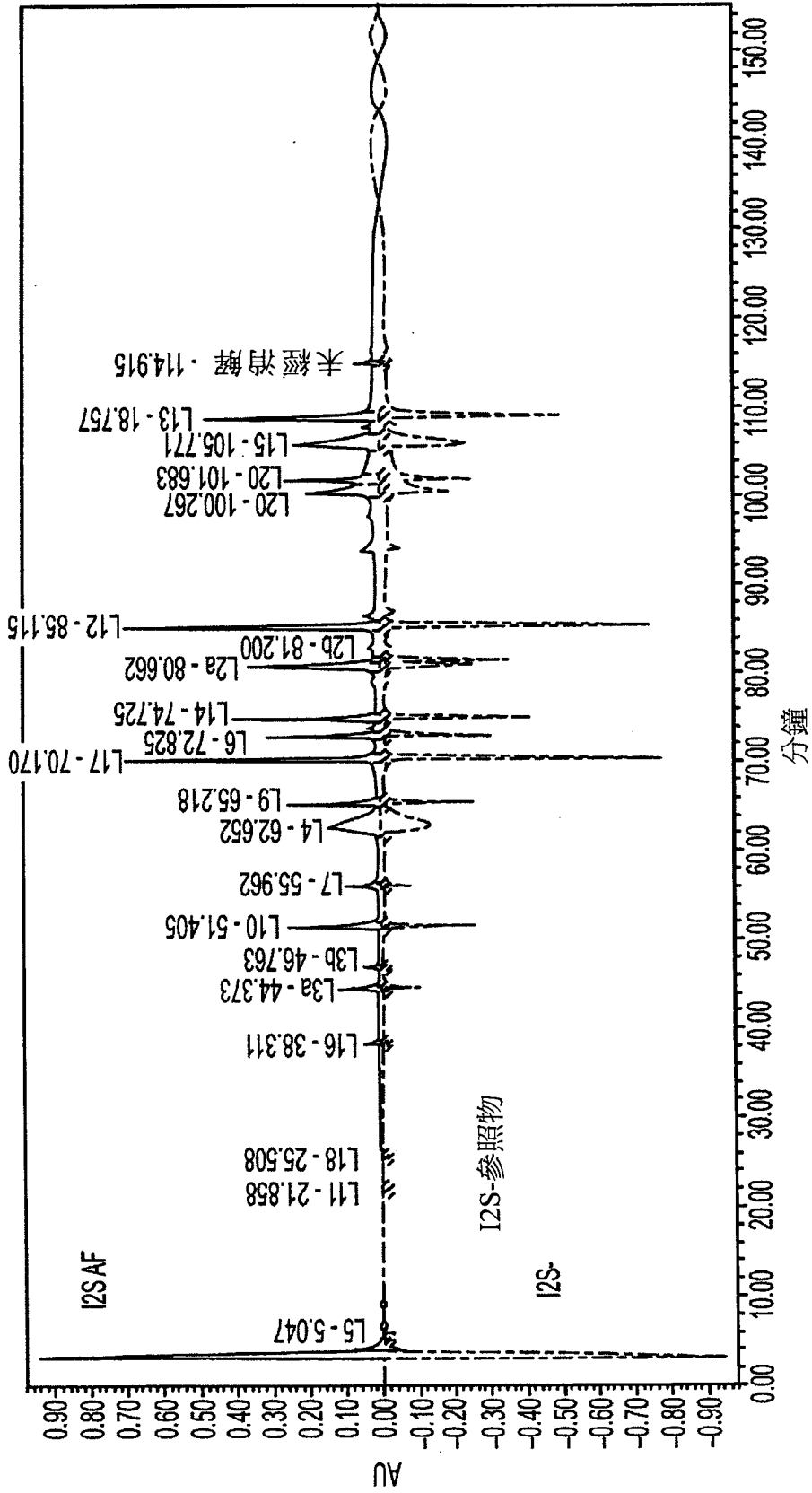


圖 9

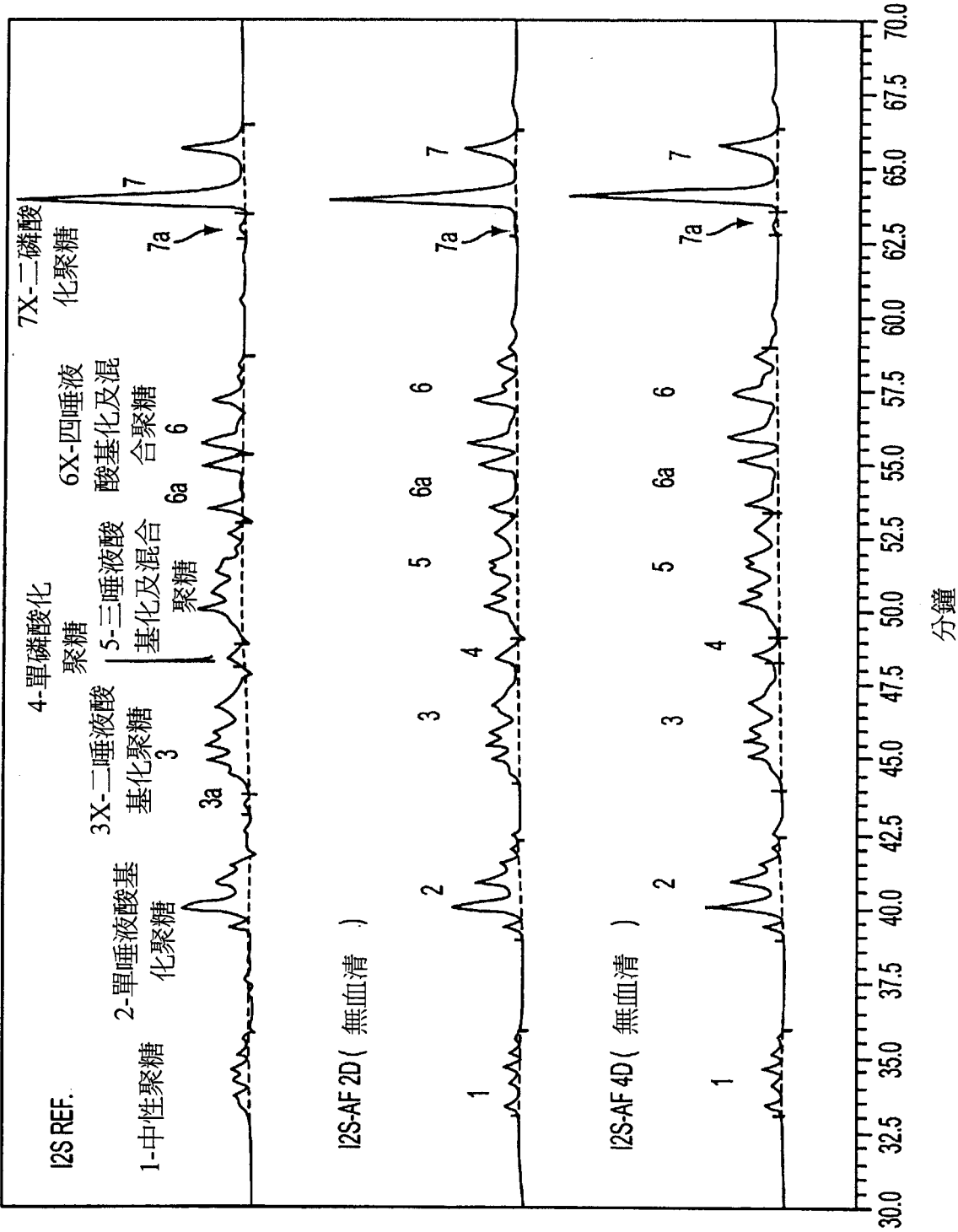


圖 10