

SIB EX4593R

P065280SM:HRG/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 13809853.8, pubblicazione n° 2867245

a nome di Shire Human Genetic Therapies, Inc.

di 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, U.S.A.

“PURIFICAZIONE DI IDURONATO-2-SOLFATASI”

Jacopo de Benedetti
USBM-043R B

DESCRIZIONE

STATO DELL'ARTE

La mucopolisaccaridosi tipo II (MPS II, sindrome di Hunter) è un disturbo di accumulo lisosomiale recessivo associato al cromosoma X che risulta da una carenza dell'enzima iduronato-2-solfatasi (I2S). I2S taglia le parti caratteristiche 2-O-solfato terminale dai glicosamminoglicani (GAG) dermatan solfato ed eparan solfato. A causa dell'enzima I2S assente o difettivo in pazienti con sindrome di Hunter, i GAG si accumulano progressivamente nei lisosomi di svariati tipi cellulari, portando a congestione cellulare, organomegalia, distruzione tissutale, e disfunzione di organi.

Generalmente, le manifestazioni fisiche per le persone con sindrome di Hunter includono sintomi sia somatici sia neuronali. Ad esempio, in alcuni casi di sindrome di Hunter, il coinvolgimento del sistema nervoso centrale porta a ritardi nello sviluppo e problemi del sistema nervoso. Sebbene i sintomi non neuronali della sindrome di Hunter siano generalmente assenti alla nascita, nel tempo l'accumulo progressivo di GAG nelle cellule del corpo può avere un effetto marcato sui tessuti periferici del corpo. L'accumulo di GAG nel tessuto periferico porta a grossolanità distintiva nei tratti del viso di un paziente ed è responsabile per la fronte prominente, ponte nasale depresso e lingua ingrossata, segni distintivi di un paziente affetto da sindrome di Hunter. In modo simile, l'accumulo di GAG può influenzare negativamente gli organi del corpo. Manifestandosi inizialmente come un ispessimento della parete di cuore, polmoni, e vie respiratorie e ingrossamento anomalo di fegato, milza e reni, queste profonde variazioni possono infine portare a un'insufficienza di organo catastrofica diffusa. Come risultato, la sindrome di Hunter è sempre grave, progressiva e terminale.

La terapia sostitutiva enzimatica (ERT) è una terapia approvata per trattare la sindrome di Hunter (MPS II), che comporta la somministrazione dell'enzima I2S di sostituzione esogeno a pazienti con sindrome di Hunter. Muenzer et al., 2007 descrive una forma ricombinante di I2S con modificazione post-traduzionale in cys59. Detto documento descrive che l'entità della modificazione post-traduzionale di cys59 in formilglicina necessaria per l'attività enzimatica è circa il 50%.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce una composizione comprendente iduronato-2-solfatasi (I2S) ricombinante purificata avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, in cui I2S ricombinante purificata comprende una conversione per almeno il 70% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di SEQ ID NO:1 in C α -formilglicina (FGly), e in cui I2S ricombinante purificata contiene meno di 150 ng/mg di proteina della cellula ospite (HCP). L'invenzione fornisce inoltre una composizione dell'invenzione, per l'uso nel trattamento della sindrome di Hunter.

SOMMARIO DELLA DESCRIZIONE

La presente descrizione fornisce metodi migliorati per purificare la proteina I2S prodotta in modo ricombinante per la terapia sostitutiva enzimatica. La presente invenzione si basa in parte sulla sorprendente scoperta che la proteina I2S ricombinante può essere purificata da materiali biologici non trattati quale terreno di coltura cellulare contenente I2S, usando un procedimento che implica quattro colonne cromatografiche. Il procedimento di purificazione esistente approvato di I2S ricombinante per la terapia sostitutiva enzimatica implica 6 colonne cromatografiche. Come descritto nel paragrafo degli esempi, le proteine I2S ricombinanti purificati usando un procedimento a quattro colonne secondo la descrizione osserva i requisiti di purezza commerciali negli US e molti altri paesi. Inoltre, l'enzima I2S ricombinante secondo la presente invenzione mantiene un'elevata percentuale di C α -formilglicina (FGly) (ad es., superiore del 70% e fino al 100%), il che è importante per l'attività dell'enzima I2S, e caratteristiche distinte quali contenuto di acido sialico e mappa dei glicani che possono facilitare la biodisponibilità e/o il targeting lisosomiale della proteina I2S ricombinante. Pertanto, la presente descrizione fornisce un procedimento efficace, più economico e più rapido per purificare la proteina I2S ricombinante. La presente descrizione è particolarmente utile per purificare la proteina I2S ricombinante prodotta in terreno privo di siero.

Pertanto, in un aspetto, la presente descrizione descrive un metodo per purificare la proteina I2S ricombinante da una preparazione impura usando un procedimento basato su una o più tra cromatografia a scambio anionico, cromatografia a scambio cationico, cromatografia in modalità mista, e cromatografia di interazione idrofoba. In alcune forme di realizzazione, il metodo secondo la presente descrizione implica meno di 6 (ad es., meno di 5,

meno di 4, o meno di 3) passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, un metodo secondo la presente descrizione implica 2, 3, 4 o 5 passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, il metodo secondo la presente descrizione implica 4 passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione contiene meno di 100 ng/mg di proteina cellulare ospite (HCP) (ad es., meno di 90 ng/mg di HCP, meno di 80 ng/mg di HCP, meno di 70 ng/mg di HCP, meno di 60 ng/mg di HCP, meno di 50 ng/mg di HCP, meno di 40 ng/mg di HCP, meno di 30 ng/mg di HCP, meno di 20 ng/mg di HCP, meno di 10 ng/mg di HCP).

In alcune forme di realizzazione, una cromatografia a scambio anionico adatta è cromatografia Q. In alcune forme di realizzazione, una cromatografia a scambio cationico adatta è cromatografia SP. In alcune forme di realizzazione, una cromatografia in modalità mista adatta è cromatografia su idrossiapatite (HA). In alcune forme di realizzazione, una cromatografia di interazione idrofoba adatta è la cromatografia con fenile.

Si contempla che la cromatografia a scambio anionico (ad es. colonna O), la cromatografia a scambio cationico (ad es. colonna SP), la cromatografia in modalità mista (ad es. colonna HA), e la cromatografia di interazione idrofoba (colonna fenile) possano essere eseguite in qualsiasi ordine. In alcune forme di realizzazione, un metodo secondo la presente descrizione esegue la cromatografia a scambio anionico (ad es. colonna O), la cromatografia a scambio cationico (ad es. colonna SP), la cromatografia in modalità mista (ad es. colonna HA), e la cromatografia di interazione idrofoba (ad es. colonna fenile) in tale ordine.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a pH di circa 5.0-7.0 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 o 7.0) e la conduttività di circa 10-20 mS/cm (ad es., 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 mS/cm) prima del caricamento della colonna per cromatografia a scambio anionico (ad es., colonna Q). In alcune forme di realizzazione, il pH è regolato usando acetato di sodio 1M. In alcune forme di realizzazione, la conduttività è regolata usando cloruro di sodio 5 M. In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia a scambio anionico, una volta caricata, è lavata usando un tampone di lavaggio comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 140 mM a 200 mM (ad es., circa 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM,

195 mM, o 200 mM) con pH di circa 5.0-7.0 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 o 7.0). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia a scambio anionico è eluita usando un tampone di eluizione comprendente un gradiente salino lineare (ad es., NaCl). In alcune forme di realizzazione, un gradiente di NaCl lineare adatto contiene un intervallo da circa 0-500 mM di NaCl (ad es., circa 0-400 mM, circa 0-350 mM, circa 0-300 mM, circa 50-500 mM, circa 150-500 mM, circa 150-450 mM, circa 150-400 mM).

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una conduttività che varia tra circa 1 mS/cm e 20 mS/cm (ad es., tra circa 1 mS/cm e 15 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 10 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 8 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 6 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 4 mS/cm, tra circa 2 mS/cm e 4 mS/cm) prima del caricamento della colonna per cromatografia a scambio cationico (ad es., colonna SP). In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una conduttività che varia tra n e circa 2 mS/cm e 4 mS/cm (ad es., 2, 2,5, 3, 3,5, o 4 mS/cm) prima del caricamento della colonna per cromatografia a scambio cationico (ad es., colonna SP). In alcune forme di realizzazione, la conduttività è regolata diluendo l'eluato dalla colonna per cromatografia a scambio anionico con H₂O a un rapporto di circa 1-2:1 (ad es., 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, o 2:1). In alcune forme di realizzazione, la conduttività è regolata mediante diafiltrazione. In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia a scambio cationico è fatta funzionare a un pH di circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0 o 6.5). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia a scambio cationico è fatta funzionare con un tampone comprendente una concentrazione di fosfato (ad es., NaPO₄) che varia da circa 0,01 M a circa 0,1 M (ad es., circa 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, o 0,1 M). In alcune forme di realizzazione, un pH adatto è circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, o 6.5).

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una concentrazione di fosfato (ad es., NaPO₄) che varia da circa 0,001 M a circa 0,01 M (ad es., circa 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, o 0,01 M) e pH di circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, o 6.5) prima del caricamento della colonna per cromatografia in modalità mista (ad es.,

colonna HA). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA), una volta caricata è lavata con un tampone di lavaggio contenente fosfato (ad es., fosfato di sodio o di potassio 1-10 mM) a pH neutro o quasi neutro. In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista caricata (ad es., colonna HA) è lavata con un tampone di lavaggio avente una concentrazione di fosfato che varia da circa 10-20 mM (ad es., circa 10-18 mM, 10-16 mM, 10-15 mM, 12-20 mM, 14-18 mM, 14-16 mM). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista caricata (ad es., colonna HA) è lavata con un tampone di lavaggio avente una concentrazione di fosfato di o superiore a 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM. In alcune forme di realizzazione, l'eluizione dalla colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA) è ottenuta con un gradiente di tampone fosfato. In alcune forme di realizzazione, un tampone di eluizione adatto può avere un gradiente di fosfato di circa 1-400 mM (ad es., 1-300 mM, 1-200 mM, 1-150 mM, 1-100 mM, 10-350 mM, 10-300 mM, 10-250 mM, 10-200 mM, 10-150 mM, 10-140 mM, 10-130 mM, 10-120 mM, 10-110 mM, 10-100 mM, 10-90 mM, 10-80 mM, 10-70 mM, 10-60 mM, 10-50 mM) fosfato di sodio o fosfato di potassio. In alcune forme di realizzazione, l'eluizione da una colonna HA è ottenuta aumentando gradualmente la concentrazione del fosfato nel tampone di eluizione. In alcune forme di realizzazione, i tamponi di eluizione graduale possono avere una concentrazione di fosfato (ad es., fosfato di sodio) selezionata tra 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. In alcune forme di realizzazione, l'eluizione da una colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA) è ottenuta mediante un tampone di eluizione avente una concentrazione di fosfato (ad es., fosfato di sodio) che varia da circa 50 mM a 150 mM (ad es., selezionata tra le concentrazioni di fosfato (ad es., fosfato di sodio) di 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, e loro combinazioni.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,5 M a circa 2,0 M (ad es., circa 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, o 2,0 M NaCl) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa

4.5, 5.0, 5.5, o 6.0) prima del caricamento sulla colonna per cromatografia di interazione idrofoba (ad es., colonna con fenile). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia di interazione idrofoba, una volta caricata, è lavata usando un tampone di lavaggio comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,5 M a 2,0 M (ad es., circa 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, o 2,0 M NaCl) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa 4.5, 5.0, 5.5, o 6.0). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia di interazione idrofoba è eluita usando un tampone di eluizione comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,1 M a circa 0,5 M (ad es., circa 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, o 0,5 M NaCl) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa 4.5, 5.0, 5.5, o 6.0).

In alcune forme di realizzazione, ciascuna colonna per cromatografia a scambio anionico, per cromatografia a scambio cationico, per cromatografia in modalità mista, e per cromatografia di interazione idrofoba ha un'altezza che varia da 14-25 cm (ad es., 15-25 cm, 15-20 cm, 14-24 cm, 14-22 cm, 14-20 cm, o 16-18 cm). In alcune forme di realizzazione, ciascuna colonna per cromatografia a scambio anionico, per cromatografia a scambio cationico, per cromatografia in modalità mista e per cromatografia di interazione idrofoba ha un'altezza di circa 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 cm.

In alcune forme di realizzazione, il metodo secondo la presente descrizione include un passaggio di inattivazione virale prima del caricamento della preparazione impura sulla prima colonna cromatografica. In alcune forme di realizzazione, il passaggio di inattivazione virale include l'aggiunta di un detergente alla preparazione impura. In alcune forme di realizzazione, il metodo secondo la presente descrizione include inoltre un passaggio di rimozione virale dopo l'ultima colonna cromatografica. In alcune forme di realizzazione, un metodo della descrizione include inoltre un passaggio di ultrafiltrazione e/o diafiltrazione. In alcune forme di realizzazione, il passaggio di ultrafiltrazione e/o diafiltrazione include lo scambio della proteina I2S ricombinante purificata in un tampone di formulazione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione è usata per purificare una proteina I2S ricombinante avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1. In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione è usata per purificare una proteina I2S ricombinante avente una sequenza amminoacidica identica a SEQ ID NO:1.

In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione è usata per purificare una proteina I2S ricombinante prodotta da cellule di mammifero coltivate in sospensione in un terreno privo di siero. In alcune forme di realizzazione, un terreno privo di siero adatto per la descrizione è privo di componenti di origine animale. In alcune forme di realizzazione, il terreno privo di siero adatto per la descrizione è un terreno chimicamente definito. In alcune forme di realizzazione, le cellule di mammifero sono coltivate in un bioreattore. In alcune forme di realizzazione, le cellule di mammifero co-esprimono la proteina I2S ricombinante e l'enzima generante la formilglicina (FGE). In alcune forme di realizzazione, le cellule di mammifero sono cellule umane.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura usata in un metodo della descrizione è preparata dal terreno privo di siero contenente proteina I2S ricombinante secreta dalle cellule di mammifero. In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura usata in un metodo della descrizione è scongelata da una preparazione di terreno congelato.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione contiene in media, 16-22 (ad es., 16-21, 16-20, 16-19, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19) acidi sialici per molecola. In alcune forme di realizzazione una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione contiene in media 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 acidi sialici per molecola.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione ha una conversione di almeno il 70% (ad es., almeno circa il 77%, l'80%, 85%, il 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di I2S umana (SEQ ID NO:1) in C_α-formilglicina (FGly). In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione ha una conversione sostanzialmente del 100% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di I2S umana (SEQ ID NO:1) in C_α-formilglicina (FGly). In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione ha attività specifica di almeno 20 U/mg, 30 U/mg, 40 U/mg, 50 U/mg, 60 U/mg, 70 U/mg, 80 U/mg, 90 U/mg, o 100 U/mg come determinato mediante un saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente descrizione è

caratterizzata da un assorbimento cellulare superiore al 70%, 75%, all'80%, 85%, al 90%, 95%, come determinato mediante un saggio di assorbimento *in vitro*.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione è caratterizzata da una mappa dei glicani comprendente sette gruppi di picchi indicativi della proteina I2S neutra (gruppo di picchi 1), mono-sialilata (gruppo di picchi 2), di-sialilata (gruppo di picchi 3), monofosforilata (gruppo di picchi 4), tri-sialilata (gruppo di picchi 5), tetra-sialilata (gruppo di picchi 6), e difosforilata (gruppo di picchi 7), rispettivamente. In alcune forme di realizzazione, la mappa dei glicani è generata dopo una digestione con neuraminidasi. In altre forme di realizzazione, la mappa dei glicani è generata dopo una digestione con fosfatasi alcalina.

Tra le altre cose, la presente invenzione fornisce la proteina I2S ricombinante purificata come descritto nella presente, e le composizioni o le formulazioni farmaceutiche contenenti la stessa. In alcune forme di realizzazione, una formulazione è formulata per la somministrazione endovenosa, sottocutanea e/o intratecale. La presente descrizione descrive anche metodi per trattare la sindrome di Hunter somministrando a un individuo che necessita di trattamento una I2S ricombinante purificata, composizione farmaceutica o formulazione contenente la stessa.

Come usato nella presente, l'espressione "proteina I2S", "I2S", "enzima I2S", o equivalenti grammaticali, indicano una preparazione di molecole di proteina I2S ricombinante se non altrimenti indicato nello specifico.

Come usato nella presente domanda, i termini "circa" e "approssimativamente" sono usati come equivalenti. Qualsiasi cifra usata nella presente domanda con o senza circa/approssimativamente è intesa coprire qualsiasi variazione normale apprezzata da un comune esperto nella tecnica pertinente.

BREVE DESCRIZIONE DEL DISEGNO

Le figure descritte di seguito, che insieme costituiscono il disegno, sono a scopo illustrativo soltanto e non limitativo.

La *Figura 1* rappresenta uno schema di purificazione esemplificativo per I2S ricombinante prodotta in terreno privo di siero.

La *Figura 2* rappresenta mappe peptidiche esemplificative di I2S AF ricombinante purificata rispetto a I2S di riferimento.

La *Figura 3* rappresenta un'analisi SDS-PAGE esemplificativa (argento) di I2S AF ricombinante.

La *Figura 4* rappresenta un'analisi di profilo di carica esemplificativa di I2S AF ricombinante purificata valutata mediante cromatografia a scambio ionico.

La *Figura 5* rappresenta i profili di mappa dei glicani esemplificativi di I2S AF ricombinante purificata.

La *Figura 6* rappresenta un'analisi esemplificativa dell'attività (U/mg) dopo un passaggio di inattivazione virale UPB di un raccolto chiarificato di I2S ricombinante.

La *Figura 7* rappresenta un'analisi esemplificativa di SEC-HPLC dopo una fase di inattivazione virale UPB di un raccolto chiarificato di I2S ricombinante.

La *Figura 8* rappresenta SDS-PAGE esemplificativa trattata con colorazione argento di proteina I2S ricombinante purificata.

La *Figura 9* mostra una mappa peptidica esemplificativa per un enzima I2S ricombinante purificato prodotto dalla linea cellulare I2S-AF 2D fatta crescere in condizioni di coltura prive di siero (riquadro superiore) rispetto a un riferimento.

La *Figura 10* rappresenta profili di glicani esemplificativi generati per gli enzimi I2S ricombinanti purificati prodotti usando le linee cellulari I2S-AF 2D e 2D fatte crescere in condizioni di coltura cellulare prive di siero rispetto a un riferimento.

La *Figura 11* rappresenta un profilo di carica esemplificativo generato per l'enzima I2S ricombinante purificato prodotto usando la linea cellulare I2S-AF 2D fatta crescere in condizioni di coltura cellulare prive di siero rispetto a un controllo di riferimento I2S.

DEFINIZIONI

Affinché la presente invenzione sia più facilmente compresa, alcuni termini sono prima definiti di seguito. Le definizioni addizionali per i seguenti termini e altri termini sono esposte in tutta la descrizione.

Approssimativamente o circa: come usato nella presente, il termine “approssimativamente” o “circa”, come

applicato a uno o più valori di interesse, indica un valore che è simile a un valore di riferimento dato. In alcune forme di realizzazione, il termine “approssimativamente” o “circa” indica un intervallo di valori che rientra nel 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, nell’11%, nel 10%, 9%, nell’8%, nel 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, nell’1%, o meno in ogni direzione (superiore o inferiore a) del valore di riferimento dato se non altrimenti indicato o altrimenti evidente dal contesto (eccetto quando tale numero supererebbe il 100% di un possibile valore).

Biologicamente attivo: come usato nella presente, l’espressione “biologicamente attivo” indica una caratteristica di qualsiasi sostanza che ha attività in un sistema biologico (*ad es.*, coltura cellulare, organismo, *ecc.*). Ad esempio, una sostanza che quando somministrata a un organismo, ha un effetto biologico su tale organismo, è considerata biologicamente attiva. L’attività biologica può anche essere determinata mediante saggi *in vitro* (ad esempio, in saggi enzimatici in vitro quali saggi di rilascio di solfato). In particolari forme di realizzazione, quando una proteina o polipeptide è biologicamente attivo, una porzione di tale proteina o polipeptide che condivide almeno un’attività biologica della proteina o polipeptide è tipicamente definita come porzione “biologicamente attiva”. In alcune forme di realizzazione, una proteina è prodotta e/o purificata da un sistema di coltura cellulare, che presenta attività biologica quando somministrato a un individuo. In alcune forme di realizzazione, una proteina richiede ulteriore processamento al fine di divenire biologicamente attiva. In alcune forme di realizzazione, una proteina richiede modificazione post-traduzionale quali, ma senza limitazioni, glicosilazione (ad *es.*, sializzazione), farnisilazione, taglio, ripiegamento, conversione in formilglicina e loro combinazioni, al fine di divenire biologicamente attiva. In alcune forme di realizzazione, una proteina prodotta come proforma (ovvero forma immatura) può richiedere la modificazione addizionale per divenire biologicamente attiva.

Recettore del mannosio-6-fosfato catione-indipendente (CI-MPR): come usato nella presente, l’espressione “recettore del mannosio-6-fosfato catione-indipendente (CI-MPR)” indica un recettore cellulare che si lega ai tag mannosio-6-fosfato (M6P) sui precursori dell’idrolasi acida nell’apparato di Golgi che sono destinati al trasporto nei lisosomi. Oltre ai mannosio-6-fosfati, CI-MPR si lega anche ad altre proteine incluse IGF-II. CI-MPR è

anche noto come “recettore di M6P/IGF-II”, “recettore di CI-MPR/IGF-II”, “recettore di IGF-II” o “recettore di IGF2”. Questi termini e le loro abbreviazioni sono usate nella presente in modo interscambiabile.

Cromatografia: come usato nella presente, il termine “cromatografia” indica una tecnica per la separazione di miscele. Tipicamente, la miscela è dissolta in un fluido definito “fase mobile” che lo trasporta attraverso una struttura che contiene un altro materiale definito “fase stazionaria”. La cromatografia su colonna è una tecnica di separazione in cui il letto stazionario è in un tubo, ovvero, una colonna.

Diluente: come usato nella presente, il termine “diluente” indica una sostanza diluente farmaceuticamente accettabile (ad es., sicuro e non tossico per la somministrazione agli esseri umani) utile per la preparazione di una formulazione ricostituita. Diluenti esemplificativi includono acqua sterile, acqua batteriostatica per iniezione (BWFI), una soluzione a pH tamponato (ad es. soluzione salina tamponata con fosfato), soluzione salina sterile, soluzione di Ringer o soluzione di destrosio.

Eluizione: come usato nella presente, il termine “eluizione” indica il procedimento di estrazione di un materiale da un altro mediante lavaggio con un solvente. Ad esempio, nella cromatografia a scambio ionico, l’eluizione è un procedimento di lavaggio di resine caricate per rimuovere gli ioni catturati.

Eluato: come usato nella presente, il termine “eluato” indica una combinazione di fase mobile “carrier” trasportatore e il materiale analita che emerge dalla cromatografia, tipicamente come risultato dell’eluizione.

Terapia sostitutiva enzimatica (ERT): come usata nella presente, l’espressione “terapia sostitutiva enzimatica (ERT)” indica qualsiasi strategia terapeutica che corregge una carenza enzimatica fornendo l’enzima mancante. Una volta somministrato, l’enzima è assorbito dalle cellule e trasportato nei lisosomi, in cui l’enzima agisce per eliminare il materiale che si è accumulato nei lisosomi a causa della carenza enzimatica. Tipicamente, affinché la terapia sostitutiva enzimatica lisosomiale sia efficace, l’enzima terapeutico è rilasciato ai lisosomi nelle cellule adatte in tessuti target in cui si è manifestato il difetto di accumulo.

Equilibrare o equilibratura: come usati nella presente, i termini “equilibrare” o “equilibratura” in relazione alla cromatografia indicano il procedimento di portare un primo liquido (ad es., tampone) in equilibrio con un altro, generalmente per ottenere una distribuzione stabile e uguale dei componenti del liquido (ad es., tampone). Ad

esempio, in alcune forme di realizzazione, una colonna cromatografica può essere equilibrata facendo passare uno o più volumi di colonna di un liquido desiderato (ad es., tampone) attraverso la colonna.

Migliorare, aumentare o ridurre: come usati nella presente, i termini “migliorare”, “aumentare” o “ridurre” o equivalenti grammaticali, indicano valori che sono relativi a una misurazione basale, quale una misurazione nello stesso individuo prima dell’inizio del trattamento descritto nella presente o una misurazione in un individuo di controllo (o più individui di controllo) in assenza del trattamento descritto nella presente. Un “individuo di controllo” è un individuo affetto dalla stessa forma di malattia di accumulo lisosomiale dell’individuo trattato, che ha circa la stessa età dell’individuo trattato (per garantire che gli stadi della malattia nell’individuo trattato e nello(negli) individuo(i) di controllo siano paragonabili).

Impurità: come usato nella presente, il termine “impurità” indica sostanze entro una quantità limitata di liquido, gas o solido che differiscono dalla composizione chimica del materiale o composto target. Le impurità sono anche definite contaminanti.

Linker: come usato nella presente, il termine “linker” indica, in una proteina di fusione, una sequenza amminoacidica diversa da quella presente in una particolare posizione nella proteina naturale ed è generalmente progettata per essere flessibile o per inserire una struttura quale un’a-elica, tra due parti caratteristiche proteiche. Un linker è anche definito uno spaziatore.

Carico: come usato nella presente, il termine “carico” indica nella cromatografia, l’addizione di un liquido o solido contenente il campione, in una colonna. In alcune forme di realizzazione, particolari componenti del campione caricato sulla colonna sono quindi catturati man mano che il campione caricato passa attraverso la colonna. In alcune forme di realizzazione, particolari componenti del campione caricato sulla colonna non sono catturati dalla colonna o “fluiscono attraverso” la colonna, man mano che il campione caricato passa attraverso la colonna.

Polipeptide: come usato nella presente, un “polipeptide”, in generale è una stringa di almeno due amminoacidi attaccati uno all’altro da un legame peptidico. In alcune forme di realizzazione, un peptide può includere almeno 3-5 amminoacidi, ciascuno dei quali è attaccato agli altri per mezzo di almeno un legame peptidico. I comuni

esperti nella tecnica apprezzeranno che i polipeptidi a volte includono amminoacidi “non naturali” o altre entità che tuttavia opzionalmente sono in grado di integrarsi in una catena polipeptidica.

Pool: come usato nella presente, il termine “pool” in relazione alla cromatografia indica la combinazione di una o più frazioni di fluido che hanno attraversato una colonna insieme. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, una o più frazioni che contengono un componente desiderato di un campione che è stato separato mediante cromatografia (ad es., “frazioni di picco”) possono essere “riunite” insieme per generare una singola frazione “riunita”.

Enzima sostitutivo: come usata nella presente, l’espressione “enzima sostitutivo” indica qualsiasi enzima che può agire per sostituire almeno in parte l’enzima carente o mancante in una malattia da trattare. In alcune forme di realizzazione, l’espressione “enzima sostitutivo” indica qualsiasi enzima che può agire per sostituire almeno in parte l’enzima lisosomiale carente o mancante in una malattia di accumulo lisosomiale da trattare. In alcune forme di realizzazione, un enzima sostitutivo è in grado di ridurre materiali accumulati nei lisosomi di mammiferi o che possono recuperare o migliorare uno o più sintomi della malattia di accumulo lisosomiale. Gli enzimi sostitutivi adatti per l’invenzione includono enzimi lisosomiali di tipo selvatico o modificati e possono essere prodotti usando metodi ricombinanti e di sintesi o purificati da fonti naturali. Un enzima sostitutivo può essere un enzima naturale o gene-attivato ricombinante, sintetico.

Solubile: come usato nella presente, il termine “solubile” indica la capacità di un agente terapeutico di formare una soluzione omogenea. In alcune forme di realizzazione, la solubilità dell’agente terapeutico nella soluzione in cui è somministrato e mediante la quale è trasportato nel sito di azione target è sufficiente a consentire il rilascio di una quantità terapeuticamente efficace dell’agente terapeutico nel sito di azione mirato. Diversi fattori possono influenzare la solubilità degli agenti terapeutici. Ad esempio, fattori rilevanti che possono influenzare la solubilità della proteina includono forza ionica, sequenza amminoacidica e la presenza di altri agenti o sali solubilizzanti (ad es., sali di calcio). In alcune forme di realizzazione, gli agenti terapeutici secondo la presente invenzione sono solubili nella loro corrispondente composizione farmaceutica.

Stabilità: come usato nella presente, il termine “stabile” indica la capacità dell’agente terapeutico (ad es., un

enzima ricombinante) di mantenere la sua efficacia terapeutica (ad es., tutta o la maggior parte della sua attività biologica e/o integrità fisicochimica prevista) per periodi di tempo prolungati. La stabilità di un agente terapeutico e la capacità della composizione farmaceutica di mantenere la stabilità di tale agente terapeutico può essere valutata per periodi di tempo prolungati (ad es., per almeno 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 mesi o più). Nel contesto di una formulazione una formulazione stabile è una in cui l'agente terapeutico nella presente essenzialmente conserva la sua integrità fisica e/o chimica e l'attività biologica dopo la conservazione e durante procedimenti (quali congelamento/scongelamento, miscelazione meccanica e liofilizzazione). Per la stabilità proteica, si può misurare mediante formazione di aggregati di elevato peso molecolare (HMW), dalla mancanza di attività enzimatica, dalla generazione di frammenti peptidici e dallo spostamento di profili di carica.

Trattamento virale: come usata nella presente, l'espressione "trattamento virale" indica la "rimozione virale" in cui i virus sono semplicemente rimossi dal campione o la "inattivazione virale" in cui i virus rimangono in un campione ma in una forma non infettiva. In alcune forme di realizzazione, la rimozione virale può usare tecniche di nanofiltrazione e/o cromatografiche tra le altre. In alcune forme di realizzazione, l'inattivazione virale può usare inattivazione con solvente, inattivazione con detergente, pastorizzazione, inattivazione a pH acido, e/o inattivazione con ultravioletti, tra gli altri.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente descrizione descrive, tra le altre cose, un metodo migliorato di purificazione della proteina I2S ricombinante per la terapia sostitutiva enzimatica in base a un procedimento che implica meno di 6 passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione descrive un metodo di purificazione della proteina I2S ricombinante da una preparazione impura usando un procedimento basato su una o più tra cromatografia a scambio anionico, cromatografia a scambio cationico, cromatografia in modalità mista, e cromatografia di interazione idrofoba. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione descrive un metodo di purificazione della proteina I2S ricombinante da una preparazione impura conducendo una cromatografia Q, cromatografia su idrossiapatite (HA), cromatografia SP, e cromatografia con fenile. La presente descrizione descrive inoltre la proteina I2S ricombinante purificata e il metodo d'uso.

Diversi aspetti dell'invenzione sono descritti in ulteriore dettaglio nei seguenti sottoparagrafi. L'uso di sottoparagrafi non intende limitare l'invenzione. Ciascun sottoparagrafo si può applicare a qualsiasi aspetto dell'invenzione. Nella presente domanda, l'uso di "o" indica "e/o" se non altrimenti indicato.

Proteina I2S ricombinante

Come usata nella presente, una proteina I2S è qualsiasi proteina o una porzione di una proteina che può sostituire l'attività almeno parziale della proteina iduronato-2-solfatasi (I2S) naturale o recuperare uno o più fenotipi o sintomi associati alla carenza di I2S. Come usate nella presente, l'espressione "un enzima I2S" e "una proteina I2S", ed equivalenti grammaticali, sono usati in modo intercambiabile.

Tipicamente, la proteina I2S umana è prodotta come forma precursore. La forma precursore di I2S umana contiene un peptide segnale (residui amminoacidici 1-25 del precursore a lunghezza completa), un pro-peptide (residui amminoacidici 26-33 del precursore a lunghezza completa), e una catena (residui 34-550 del precursore a lunghezza completa) che può essere ulteriormente processata nella catena da 42 kDa (residui 34-455 del precursore a lunghezza completa) e la catena di 14 kDa (residui 446-550 del precursore a lunghezza completa). Tipicamente, la forma precursore è anche definita come precursore a lunghezza completa o proteina I2S a lunghezza completa, che contiene 550 amminoacidi. Le sequenze amminoacidiche della forma matura (SEQ ID NO:1) aventi il peptide segnale rimosso e il precursore a lunghezza completa (SEQ ID NO:2) di una proteina I2S umana di tipo selvatico o naturale tipica sono mostrati in tabella 1. Il peptide segnale è sottolineato. Inoltre, le sequenze amminoacidiche del precursore isoforma a e b della proteina I2S umana sono anche fornite in tabella 1, SEQ ID NO:3 e 4, rispettivamente.

Tabella 1. Iduronato-2-solfatasi umana

Forma matura	SETQANSTTDALNVLIIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRS PNIDQLASHLLFQNAF AQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTM SVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSEKYENTKTCRGPDGELHANLLC PVDVLDVPEGLTLPDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKE FKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPV DFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGVALGEHG EWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQ SMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEE DPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVW VGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:1)
---------------------	---

<p>Precursore a lunghezza completa (Isoforma a)</p>	<p>MPPPRTGRGLLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFN SYWRVHAGNFSTI PQYFKENGYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPDKQSTEQAIQLEK KTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL DDLQLANSTIIAFTSDHGVALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFVYVGRASLP EAGEKLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPV PSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNS DKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPEDEFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:2)</p>
<p>Precursore Isoforma b</p>	<p>MPPPRTGRGLLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFN SYWRVHAGNFSTI PQYFKENGYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPDKQSTEQAIQLEK KTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQEDQSSTGFRKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)</p>
<p>Precursore Isoforma c</p>	<p>MPPPRTGRGLLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFN SYWRVHAGNFSTI PQYFKENGYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPDKQSTEQAIQLEK KTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL DDLQLANSTIIAFTSDHGFLMRTNT (SEQ ID No:4)</p>

Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è una proteina I2S umana matura (SEQ ID NO:1). Come descritto nella presente, SEQ ID NO:1 rappresenta la sequenza amminoacidica canonica per la proteina I2S umana. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S può essere una isoforma di splicing e/o una variante di SEQ ID NO:1, derivante dalla trascrizione in un sito di inizio alternativo entro la 5' UTR del gene di I2S. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante può essere un omologo o un analogo della proteina I2S umana matura. Ad esempio, un omologo o un analogo della proteina I2S umana matura può essere una proteina I2S umana matura modificata contenente una o più sostituzioni, delezioni e/o inserzioni amminoacidiche rispetto alla proteina I2S di tipo selvatico o naturale (ad es., SEQ ID NO:1), pur conservando l'attività della proteina I2S sostanziale. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente omologa alla proteina I2S umana matura (SEQ ID NO:1). In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante ha una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più omologa a SEQ ID NO:1. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente identica alla proteina I2S umana matura (SEQ ID NO:1). In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante ha una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica a SEQ ID NO:1. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante contiene un frammento o una porzione di una proteina I2S umana matura.

In alternativa, una proteina I2S ricombinante è la proteina I2S a lunghezza completa. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante può essere un omologo o analogo della proteina I2S umana a lunghezza completa. Ad esempio, un omologo o un analogo della proteina I2S umana a lunghezza completa può essere una proteina I2S umana a lunghezza completa modificata contenente una o più sostituzioni, delezioni e/o inserzioni amminoacidiche rispetto alla proteina I2S a lunghezza completa di tipo selvatico o naturale (ad es., SEQ ID NO:2), pur conservando l'attività della proteina I2S sostanziale. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente omologa alla proteina I2S umana a lunghezza completa (SEQ ID NO:2). Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% a SEQ ID NO:2. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente identica a SEQ ID NO:2. Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica a SEQ ID NO:2. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante contiene un frammento o una porzione di una proteina I2S umana a lunghezza completa. Come usata nella presente, una proteina I2S a lunghezza completa tipicamente contiene una sequenza del peptide segnale.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è una proteina I2S umana isoforma a. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante può essere un omologo o un analogo di una proteina I2S umana isoforma a. Ad esempio, un omologo o un analogo di una proteina I2S umana isoforma a può essere una proteina I2S umana isoforma a modificata contenente una o più sostituzioni, delezioni e/o inserzioni

amminoacidiche rispetto a una proteina I2S umana isoforma a di tipo selvatico o naturale (ad es., SEQ ID NO:3), pur conservando l'attività della proteina I2S sostanziale. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente omologa alla proteina I2S umana isoforma a (SEQ ID NO:3). Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più omologa a SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente identica a SEQ ID NO:3. Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica a SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante contiene un frammento o una porzione di una proteina I2S umana isoforma a. Come usata nella presente, una proteina I2S umana isoforma a tipicamente contiene una sequenza del peptide segnale.

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è una proteina I2S umana isoforma b. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante può essere un omologo o un analogo di una proteina I2S umana isoforma b. Ad esempio, un omologo o un analogo di una proteina I2S umana isoforma b può essere una proteina I2S umana isoforma b modificata contenente una o più sostituzioni, delezioni e/o inserzioni amminoacidiche rispetto a una proteina I2S isoforma b di tipo selvatico o naturale (ad es., SEQ ID NO:4), pur conservando l'attività della proteina I2S sostanziale. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente omologa a una proteina I2S umana isoforma b (SEQ ID NO:4). Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più omologa a SEQ ID NO:4. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è sostanzialmente identica a SEQ ID NO:4. Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può avere una sequenza amminoacidica almeno del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più identica a SEQ ID NO:4. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante contiene un frammento o una porzione della proteina I2S umana isoforma b. Come usato nella presente, una proteina I2S umana isoforma b

tipicamente contiene una sequenza del peptide segnale.

Omologhi o analoghi delle proteine I2S umane possono essere preparati secondo i metodi per modificare la sequenza polipeptidica noti a un comune esperto nella tecnica, quali sono trovati nei riferimenti che elencano tali metodi. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni conservative di amminoacidi includono sostituzioni apportate tra amminoacidi nei seguenti gruppi: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D. In alcune forme di realizzazione, una “sostituzione amminoacidica conservativa” indica una sostituzione amminoacidica che non modifica le relative caratteristiche di carica o dimensione della proteina in cui è apportata la sostituzione amminoacidica.

In alcune forme di realizzazione, le proteine I2S ricombinanti possono contenere una parte caratteristica che si lega a un recettore sulla superficie delle cellule target per facilitare l'assorbimento cellulare e/o il targeting lisosomiale. Ad esempio, un tale recettore può essere il recettore del mannosio-6-fosfato catione-indipendente (CI-MPR) che si lega ai residui mannosio-6-fosfato (M6P). Inoltre, CI-MPR si lega anche ad altre proteine incluse IGF-II. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante contiene residui M6P sulla superficie della proteina. In particolare, una proteina I2S ricombinante può contenere oligosaccaridi bis-fosforilati che hanno un'affinità di legame più elevata a CI-MPR. In alcune forme di realizzazione, un enzima adatto contiene fino a circa una media di circa almeno il 20% di oligosaccaridi bis-fosforilati per enzima. In altre forme di realizzazione, un enzima adatto può contenere circa il 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% di oligosaccaridi bis-fosforilati per enzima.

In alcune forme di realizzazione, gli enzimi I2S ricombinanti possono essere fusi a una parte caratteristica di targeting lisosomiale che è in grado di legarsi a un recettore sulla superficie delle cellule target. Una parte caratteristica di targeting lisosomiale adatta può essere IGF-I, IGF-II, RAP, p97, e loro varianti, omologhi o frammenti (ad es., inclusi quei peptidi aventi una sequenza almeno del 70%, 75%, dell'80%, 85%, del 90%, o 95% identica a una sequenza del peptide IGF-I, IGF-II, RAP, p97 umano maturo di tipo selvatico. La parte caratteristica di targeting lisosomiale può essere coniugata o fusa a una proteina o enzima I2S a N-terminale, C-terminale o a livello interno.

Produzione di proteine I2S ricombinanti

I metodi descritti nella presente possono essere usati per purificare una proteina I2S ricombinante prodotta mediante diversi mezzi. Ad esempio, una proteina I2S può essere prodotta in modo ricombinante usando un sistema cellulare ospite ingegnerizzato per esprimere un acido nucleico codificante I2S. In alternativa, una proteina I2S può essere prodotta attivando un gene di I2S endogeno.

Si contempla che i metodi descritti nella presente possano essere usati per purificare una proteina I2S ricombinante prodotta usando diversi sistemi di espressione. Sistemi di espressione adatti includono, ad esempio, cellule uovo, baculovirus, vegetali, di lievito o di mammifero.

In alcune forme di realizzazione, gli enzimi I2S sono prodotti in cellule di mammifero. Esempi non limitativi di cellule di mammifero che possono essere usate secondo i metodi descritti nella presente includono linea di mieloma murino BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); retinoblasti umani (PER.C6, CruCell, Leiden, Paesi Bassi); linea CV1 di rene di scimmia trasformato mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linea di rene embrionale umana (cellule HEK293 o cellule 293 subclonate per la crescita in coltura in sospensione, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); linea cellulare di fibrosarcoma umano (ad es., HT1080); cellule renali di criceto neonato (BHK21, ATCC CCL 10); cellule di ovaio di criceto cinese DHFR +/- (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); cellule del sertoli murine (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); cellule renali di scimmia (CV1 ATCC CCL 70); cellule renali di scimmia verde africana (VERO-76, ATCC CRL-1 587); cellule di carcinoma cervicale umano (HeLa, ATCC CCL 2); cellule renali canine (MDCK, ATCC CCL 34); cellule epatiche di ratto Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); cellule polmonari umane (W138, ATCC CCL 75); cellule epatiche umane (Hep G2, HB 8065); tumore mammario murino (MMT 060562, ATCC CCL51); cellule TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); cellule MRC 5; cellule FS4; e una linea di epatoma umano (Hep G2).

In alcune forme di realizzazione, i metodi della presente descrizione sono usati per purificare gli enzimi I2S ricombinanti prodotti da cellule umane (ad es., HT1080). In alcune forme di realizzazione, i metodi della presente descrizione sono usati per purificare enzimi I2S ricombinanti prodotti dalle cellule CHO.

Tipicamente, le cellule che sono ingegnerizzate per esprimere I2S ricombinante possono comprendere un transgene che codifica una proteina I2S ricombinante descritta nella presente. Si dovrebbe apprezzare che gli acidi nucleici codificanti I2S ricombinanti possono contenere sequenze regolatrici, sequenze di controllo genico, promotori, sequenze non codificanti e/o altre sequenze adatte per l'espressione della I2S ricombinante. Tipicamente, la regione codificante è funzionalmente legata a uno o più di questi componenti dell'acido nucleico.

“Sequenze regolatrici” tipicamente indica sequenze nucleotidiche situate a monte (sequenze non codificanti 5'), entro o a valle (sequenze non codificanti 3') di una sequenza codificante, e che influenzano la trascrizione, il processamento o la stabilità di RNA, o la traduzione delle sequenze codificanti associate. Le sequenze regolatrici possono includere promotori, sequenze leader di traduzione, introni, e sequenze di riconoscimento di poliadenilazione. A volte, “sequenze regolatrici” sono anche definite “sequenze di controllo genico”.

“Promotore” tipicamente indica una sequenza nucleotidica in grado di controllare l'espressione di una sequenza codificante o di RNA funzionale. In generale, una sequenza codificante è situata in 3' rispetto a una sequenza promotore. La sequenza promotore è costituita da elementi a monte prossimali e più distali, gli ultimi elementi spesso definiti potenziatori. Di conseguenza, un “potenziatore” è una sequenza nucleotidica che può stimolare l'attività del promotore e può essere un elemento innato del promotore o un elemento eterologo inserito per potenziare il livello o la specificità tissutale di un promotore. I promotori possono derivare nella loro interezza da un gene nativo o essere costituiti da elementi differenti derivati da promotori differenti presenti in natura o anche comprendere segmenti nucleotidici sintetici. Gli esperti nella tecnica comprendono che promotori differenti possono dirigere l'espressione di un gene in tessuti o tipi cellulari differenti, o a stadi di sviluppo differenti o in risposta a condizioni ambientali differenti.

Le “sequenze non codificanti 3'” tipicamente indicano sequenze nucleotidiche situate a valle di una sequenza codificante e includono sequenze di riconoscimento di poliadenilazione e altre sequenze codificanti segnali regolatori in grado di influenzare il processamento di mRNA o l'espressione genica. Il segnale di poliadenilazione è usualmente caratterizzato dal fatto di influenzare l'aggiunta di tratti di acido poliadenilico

all'estremità 3' del precursore di mRNA.

La "sequenza leader di traduzione" o "sequenza non codificante 5'" tipicamente indica una sequenza nucleotidica situata tra la sequenza promotore di un gene e la sequenza codificante. La sequenza leader di traduzione è presente in mRNA completamente processato a monte della sequenza di inizio traduzione. La sequenza leader di traduzione può influenzare il processamento del trascritto primario in mRNA, la stabilità di mRNA o l'efficacia di traduzione.

Tipicamente, l'espressione "legato in modo funzionale" o "funzionalmente legato" indica l'associazione di due o più frammenti di acido nucleico su un singolo frammento di acido nucleico in modo che la funzione di uno sia influenzata dall'altro. Ad esempio, un promotore è funzionalmente legato ad una sequenza codificante quando è in grado di influenzare l'espressione di quella sequenza codificante (ovvero, la sequenza codificante è sotto il controllo trascrizionale del promotore). Le sequenze codificanti possono essere funzionalmente legate a sequenze regolatrici in orientamento senso o antisenso.

La regione codificante di un transgene può includere una o più mutazioni silenti per ottimizzare il codon usage per un particolare tipo cellulare. Ad esempio, i codoni di un transgene di I2S possono essere ottimizzati per l'espressione in una cellula di vertebrato. In alcune forme di realizzazione, i codoni di un transgene di I2S possono essere ottimizzati per l'espressione in una cellula di mammifero. In alcune forme di realizzazione, i codoni di un transgene di I2S possono essere ottimizzati per l'espressione in una cellula umana.

Opzionalmente, un costrutto può contenere componenti addizionali quali uno o più dei seguenti: un sito di splicing, una sequenza potenziatore, un gene marker selezionabile sotto il controllo di un promotore adatto, un gene marker amplificabile sotto il controllo di un promotore adatto, e una regione di attacco alla matrice (MAR) o altro elemento noto nella tecnica che potenzia l'espressione della regione dove esso è inserito.

Una volta transfettato o trasdotto in cellule ospite, un vettore adatto può esprimere a livello extracromosomico (episomiale) o integrarsi nel genoma della cellula ospite.

Attivazione di proteine I2S ricombinanti

Tipicamente, un enzima I2S ricombinante è attivato dalla modificazione post-traduzionale di una cisteina

conservata (corrispondente all'amminoacido 59 della I2S umana matura) in formilglicina, anche nota come acido 2-ammino-3-ossopropionico, o osso-alanina. Tale modificazione post-traduzionale può essere realizzata da un enzima noto come enzima generante formilglicina (FGE). Pertanto, in alcune forme di realizzazione, gli enzimi I2S ricombinanti sono prodotti in cellule che esprimono anche la proteina FGE. In particolari forme di realizzazione, gli enzimi I2S ricombinanti sono prodotti in cellule che hanno espressione aumentata o potenziata della proteina FGE. Ad esempio, le cellule possono essere ingegnerizzate per sovraesprimere FGE in combinazione con I2S ricombinante per facilitare la produzione di preparazioni di I2S aventi elevati livelli di enzima attivo. In alcune forme di realizzazione, la sovraespressione di FGE è ottenuta mediante espressione (ad es., sovraespressione) di un FGE esogeno usando tecnologia ricombinante standard. In alcune forme di realizzazione, la sovraespressione di FGE è ottenuta mediante espressione attivata o potenziata di un FGE endogeno, ad esempio, attivando o potenziando il promotore del gene di FGE endogeno. In alcuni casi, l'acido nucleico codificante I2S ricombinante e l'acido nucleico codificante una proteina FGE ricombinante sono legati mediante un acido nucleico (*ad es.*, una sequenza spaziatore) avente una sequenza corrispondente a un sito interno di entrata del ribosoma.

Qualsiasi FGE avente capacità di convertire la cisteina in formilglicina può essere usato nei metodi della descrizione. Sequenze di acido nucleico e amminoacidiche esemplificative per le proteine FGE sono descritte in US 2004-0229250. Si dovrebbe apprezzare che gli acidi nucleici codificanti FGE ricombinante possono comprendere sequenze regolatrici, sequenze di controllo genico, promotori, sequenze non codificanti e/o altre sequenze adatte per esprimere FGE. Tipicamente, la regione codificante è funzionalmente legata a uno o più di questi componenti dell'acido nucleico.

Terreno e condizione di coltura cellulare

Diversi terreni e condizioni di coltura cellulare possono essere usati per produrre una proteina I2S ricombinante. Ad esempio, una proteina I2S ricombinante può essere prodotta in terreno contenente siero o privo di siero. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è prodotta in un terreno privo di siero. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è prodotta in un terreno privo di componenti animali,

ovvero, un terreno che è privo di componenti di origine animale. In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante è prodotta in un terreno chimicamente definito. Come usata nella presente, l'espressione "terreno nutritivo chimicamente definito" indica un terreno del quale sostanzialmente tutti i componenti chimici sono noti. In alcune forme di realizzazione, un terreno nutritivo chimicamente definito è privo di componenti di origine animale quali siero, proteine derivate dal siero (ad es., albumina o fetuina), e altri componenti. In alcuni casi, un terreno chimicamente definito comprende una o più proteine (ad es., fattori di crescita proteici o citochine). In alcuni casi un terreno nutritivo chimicamente definito comprende uno o più idrolizzati proteici. In altri casi, un terreno nutritivo chimicamente definito è un terreno privo di proteine, ovvero, un terreno privo di siero che non contiene proteine, idrolizzati o componenti di composizione sconosciuta.

In alcune forme di realizzazione, un terreno chimicamente definito può essere integrato con uno o più componenti di origine animale. Tali componenti di origine animale includono, senza limitazioni, siero di vitello fetale, siero di cavallo, siero di capra, siero di asino, siero umano, e proteine derivate dal siero quali albumine (ad es., siero albumina bovina o siero albumina umana).

Si possono usare diverse condizioni di coltura cellulare per produrre proteine I2S ricombinanti su ampia scala incluse, senza limitazioni, colture in bottiglie rotanti, colture in bioreattore discontinuo e colture in bioreattore a ciclo chiuso. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante è prodotta da cellule coltivate in sospensione. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante è prodotta dalle cellule aderenti.

Terreni cellulari e condizioni di coltura esemplificativi sono descritti nella sezione degli esempi. Metodi e composizioni esemplificativi addizionali per produrre la proteina I2S ricombinante sono descritti nella domanda provvisoria intitolata "Methods and Compositions for Producing Recombinant Iduronate-2-Sulfatase" depositata con la presente alla stessa data, l'intera descrizione della quale è incorporata nella presente per riferimento.

Purificazione di proteina I2S ricombinante

In alcune forme di realizzazione della presente descrizione, un metodo per purificare la proteina I2S ricombinante da una preparazione impura può essere ottenuto usando un procedimento basato su una o più tra cromatografia a scambio anionico, cromatografia a scambio cationico, cromatografia in modalità mista, e

cromatografia di interazione idrofoba. In alcune forme di realizzazione, il metodo implica meno di 6 (ad es., meno di 5, meno di 4, o meno di 3) passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, il metodo implica 2, 3, 4 o 5 passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, il metodo implica 4 passaggi cromatografici. In alcune forme di realizzazione, il metodo secondo la presente descrizione conduce la cromatografia a scambio anionico, la cromatografia in modalità mista, la cromatografia a scambio cationico, e la cromatografia di interazione idrofoba in quest'ordine.

Preparazione impura

Come usato nella presente, una preparazione impura può essere qualsiasi materiale biologico incluso materiale biologico non trattato contenente proteina I2S ricombinante. Ad esempio, una preparazione impura può essere un terreno di coltura cellulare non trattato contenente proteina I2S ricombinante secreta dalle cellule (ad es., cellule di mammifero) produttori proteina I2S o lisati cellulari grezzi contenenti proteina I2S. In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura può essere un terreno cellulare parzialmente trattato o lisati cellulari. Ad esempio, il terreno cellulare e i lisati cellulari possono essere concentrati, diluiti, trattati con inattivazione virale, trattamento virale o rimozione virale. In alcune forme di realizzazione, la rimozione virale può usare tecniche di nanofiltrazione e/o cromatografiche tra le altre. In alcune forme di realizzazione, l'inattivazione virale può usare inattivazione con solventi, inattivazione con detergente, pasterizzazione, inattivazione a pH acido e/o inattivazione con ultravioletti, tra le altre. Il terreno cellulare o i lisati cellulari possono anche essere trattati con proteasi, DNasi e/o RNasi per ridurre il livello di proteine e/o acidi nucleici della cellula ospite (ad es., DNA o RNA). In alcune forme di realizzazione, i materiali biologici non trattati o parzialmente trattati (ad es., terreno cellulare o lisato cellulare) possono essere congelati e conservati a una temperatura desiderata (ad es., 2-8°C, -4°C, -25°C, -75°C) per un periodo di tempo e quindi scongelati per la purificazione. Come usata nella presente, una preparazione impura è definita anche materiale di partenza o materiale di carico.

Cromatografia a scambio anionico

In alcune forme di realizzazione, i metodi per purificare I2S ricombinante includono cromatografia a scambio anionico. In breve, la cromatografia a scambio anionico è una tecnica cromatografica che si basa sulle interazioni

carica-carica tra un composto a carica negativa e una resina a carica positiva. In alcune forme di realizzazione, la cromatografia a scambio anionico è una cromatografia a scambio anionico forte. In alcune forme di realizzazione, la cromatografia a scambio anionico è usata come un primo passaggio di purificazione per una proteina terapeutica (ad es., I2S ricombinante).

Le resine a scambio anionico esemplificative includono, senza limitazioni, resine a base di ammina quaternaria o "resine-Q" (ad es., Capto™-Q, Q-Sepharose®, QAE Sephadex®); resine dietilamminoetano (DEAE) (ad es., DEAE-Trisacryl®, DEAE Sepharose®, DEAE benzoilato naftoilato, dietilamminoetil Sephacel®); resine Amberjet®; resine Amberlyst®; resine Amberlite® (ad es., Amberlite® IRA-67, Amberlite® fortemente basiche, Amberlite® debolmente basica), resina colestiramina, resine ProPac® (ad es., ProPac® SAX-10, ProPac® WAX-10, ProPac® WCX-10); resine TSK-GEL® (ad es., TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); e resine Acclaim®. In alcune forme di realizzazione, la resina a scambio anionico è una resina Q.

La fase mobile tipica per la cromatografia a scambio anionico include soluzioni relativamente polari, quali acqua, acetonitrile, alcol organici quali metanolo, etanolo, e isopropanolo, o soluzioni contenenti acido 2-(N-morfolino)-etansolfonico (MES). Pertanto, in alcune forme di realizzazione, la fase mobile include circa lo 0%, l'1%, il 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, l'80%, 85%, il 90%, 95%, o circa il 100% di soluzione polare. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile comprende da circa l'1% a circa il 100%, da circa il 5% a circa il 95%, da circa il 10% a circa il 90%, da circa il 20% a circa l'80%, da circa il 30% a circa il 70%, o da circa il 40% a circa il 60% di soluzione polare in qualsiasi momento dato durante il corso della separazione.

Generalmente, una fase mobile include un sale. Ad esempio, un sale (ad es., cloruro di sodio) può eluire una proteina legata da una colonna a scambio anionico (ad es., il controione è il cloruro ed è scambiato con la proteina target, che quindi è rilasciata). In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include una concentrazione salina da circa 0 a circa 1,0M, ad es., da circa 0 a circa 0,8M, da circa 0 a circa 0,6M, da circa 0 a circa 0,5M, da circa 0 a circa 0,4M, da circa 0,05M a circa 0,50M, da circa 0,10M a circa 0,45M, da circa 0,10M a circa 0,40M, o da circa 0,15M a circa 0,40M. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include una

concentrazione salina di approssimativamente 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M, 0,05M, 0,06M, 0,07M, 0,08M, 0,09M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, o 1,0M. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile è un gradiente (ad es., un gradiente lineare o non lineare). In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile è costante. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile può aumentare o ridursi gradualmente.

Tipicamente, la fase mobile è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile non è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 14. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 10. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 7. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH di circa 6.5. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH di circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, o 10.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a pH di circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 o 7.5 e la conduttività di circa 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, o 20 mS/cm prima del caricamento nella colonna per cromatografia a scambio anionico (ad es., colonna Q). Il pH può essere regolato usando acetato di sodio (ad es., 1M) e la conduttività può essere regolata usando cloruro di sodio (ad es., 5M). Una volta caricata una colonna per cromatografia a scambio anionico può essere lavata usando un tampone di lavaggio comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 140 mM a circa 200 mM (ad es., circa 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM, o 200 mM) con pH di circa 5.0-7.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 o 7.5). Una colonna per cromatografia a scambio anionico può essere eluita usando un tampone di eluizione comprendente un gradiente di NaCl lineare. Un gradiente di NaCl lineare esemplificativo adatto può contenere un intervallo da circa 0-500 mM di NaCl (ad es., circa 0-400 mM, circa 0-350 mM, circa 0-300 mM, circa 50-500 mM, circa 150-500 mM, circa 150-450 mM, circa 150-400 mM).

Cromatografia a scambio cationico

In alcune forme di realizzazione, i metodi per purificare I2S ricombinante includono cromatografia a scambio cationico. In breve, la cromatografia a scambio cationico è una tecnica cromatografica che si basa sulle interazioni carica-carica tra un composto a carica positiva e una resina a carica negativa. In alcune forme di realizzazione, la cromatografia a scambio cationico è cromatografia a scambio cationico forte.

La cromatografia a scambio cationico è generalmente eseguita con una colonna a scambio cationico forte o debole, contenente uno ione solfonio o con uno scambiatore cationico debole, avente usualmente un gruppo funzionale carbossimetile (CM) o carbossilato (CX). Sono note nella tecnica molte resine a scambio cationico adatte e sono disponibili in commercio e includono, senza limitazioni SP-Sepharose®, CM Sepharose®; resine Amberjet®; resine Amberlyst®; resine Amberlite® (*ad es.*, Amberlite® IRA120); resine ProPac® (*ad es.*, ProPac® ScX-10, ProPac® WCX-10, ProPac® WCX-10); resine TSK-GEL® (*ad es.*, 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, e TSKgel CM-STAT); e resine Acclaim®. In alcune forme di realizzazione, la resina a scambio anionico è una SP-Sepharose resin®.

Fasi mobili tipiche per la cromatografia a scambio cationico includono soluzioni relativamente polari, quali acqua, acetonitrile, alcol organici quali metanolo, etanolo e isopropanolo, o soluzioni contenenti acido 2-(N-morfolino)-etansolfonico (MES). Pertanto, in alcune forme di realizzazione, la fase mobile include circa lo 0%, l'1%, il 2%, 4%, 6%, l'8%, il 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, l'80%, 85%, il 90%, 95%, o circa il 100% di soluzione polare. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include da circa l'1% a circa il 100%, da circa il 5% a circa il 95%, da circa il 10% a circa il 90%, da circa il 20% a circa l'80%, da circa il 30% a circa il 70%, o da circa il 40% a circa il 60% di soluzione polare in qualunque dato momento durante il corso della separazione.

Generalmente, una fase mobile include un sale. Ad esempio, un sale (*ad es.*, cloruro di sodio, fosfato di sodio, ecc.) può eluire una proteina legata da una colonna a scambio cationico (*ad es.*, il controione è sodio ed è scambiato con la proteina target, che è quindi rilasciata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include una concentrazione salina da circa 0 a circa 1,0M, *ad es.*, da circa 0 a circa 0,8M, da circa 0 a circa 0,6M, da

circa 0 a circa 0,5M, da circa 0 a circa 0,4M, da circa 0,05M a circa 0,50M, da circa 0,10M a circa 0,45M, da circa 0,10M a circa 0,40M, o da circa 0,15M a circa 0,40M. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include una concentrazione salina di circa 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M, 0,05M, 0,06M, 0,07M, 0,08M, 0,09M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, o 1,0M. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile è un gradiente (ad es., un gradiente lineare o non lineare). In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile è costante. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione salina nella fase mobile può aumentare o ridursi gradualmente.

Tipicamente, la fase mobile è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile non è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 14. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 10. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 7. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH di circa 6.5. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH di circa 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, o 10.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolata/o a un intervallo di conduttività tra circa 1 mS/cm e 20 mS/cm (ad es., tra circa 1 mS/cm e 15 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 10 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 8 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 6 mS/cm, tra circa 1 mS/cm e 4 mS/cm, tra circa 2 mS/cm e 4 mS/cm) prima del caricamento nella colonna per cromatografia a scambio cationico (ad es., colonna SP). In particolari forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una conduttività che varia tra n circa 2 mS/cm e 4 mS/cm (ad es., 2, 2,5, 3, 3,5, o 4 mS/cm) prima del caricamento nella colonna per cromatografica a scambio cationico (ad es., colonna SP). La conduttività può essere regolata diluendo una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante con H₂O a, ad es., a un rapporto 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, o 10:1. La conduttività può anche essere regolata mediante diafiltrazione in un tampone desiderato. In alcune forme di realizzazione, una colonna per cromatografia a scambio cationico è fatta funzionare a un pH di circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0 o 6.5). In alcune forme di realizzazione, una colonna per cromatografia a scambio

cationico è fatta funzionare con un tampone comprendente la concentrazione di fosfato (ad es., NaPO_4) che varia da circa 0,01 M a circa 0,1 M (ad es., circa 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, o 0,1 M). In alcune forme di realizzazione, un pH adatto è circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, o 6.5).

Cromatografia in modalità mista

La cromatografia su idrossiapatite (HA) è considerata essere una cromatografia di “pseudo-affinità” o a scambio ionico in “modalità mista” e può essere usata secondo i metodi descritti nella presente. L'idrossiapatite è una forma unica di fosfato di calcio usata nel frazionamento e nella purificazione di molecole biologiche. In alcuni casi, si può usare idrossiapatite cristallina sebbene la fragilità dei cristalli possa limitare la portata e/o la longevità della colonna. Due tipi di idrossiapatite ceramica chimicamente pura, idrossiapatite ceramica CHT tipo I e tipo II sono macroporose, sferiche e possono essere usate a elevate portate e pressioni. Il tipo I generalmente ha una elevata capacità legante le proteine, mentre il tipo II generalmente ha una capacità legante inferiore per le proteine. In generale, la formula di idrossiapatite è $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kawasaki, et al 1985). I gruppi funzionali includono coppie a carica positiva di ioni calcio cristallini (siti C) e cluster di sei atomi di ossigeno a carica negativa associati a tripletti di fosfati cristallini (siti P). I siti C, i siti P e gli ossidrili sono distribuiti in un pattern fisso sulla superficie cristallina, generalmente portando a interazioni complesse con le proteine e altre molecole.

Un campione può essere caricato su una colonna HA in un tampone fosfato a bassa forza ionica (ad es., fosfato di sodio o di potassio 1-10 mM) a pH neutro o quasi neutro. In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a una concentrazione di fosfato (ad es., NaPO_4) che varia da circa 0,001 M a circa 0,01 M (ad es., circa 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, o 0,01 M) e pH di circa 5.0-6.5 (ad es., circa 5.0, 5.5, 6.0, o 6.5) prima di caricare la colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA). La colonna HA caricata è tipicamente lavata con un tampone di lavaggio avente una concentrazione di fosfato paragonabile a quella del tampone di caricamento. In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA), una volta caricata è lavata con un tampone di lavaggio contenente fosfato (ad es., fosfato di sodio o di potassio 1-10 mM) a pH neutro o quasi neutro. Ad esempio, un tampone di lavaggio adatto può avere una

concentrazione di fosfato di circa 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, o 10 mM. In alcune forme di realizzazione, può essere preferibile aumentare la quantità di fosfato nel tampone di lavaggio per creare condizioni di lavaggio più stringenti. Si contempla che i livelli di M6P, in particolare i livelli di-M6P, sulla superficie delle proteine I2S siano importanti per il targeting lisosomiale. La concentrazione di fosfato aumentata nel tampone di lavaggio può trattenere selettivamente le proteine I2S con elevati livelli di M6P, in particolare, di-M6P sulla colonna HA. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, un tampone di lavaggio desiderato può avere una concentrazione di fosfato di o superiore a 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM. In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista caricata (ad es., colonna HA) è lavata con un tampone di lavaggio avente una concentrazione di fosfato che varia da circa 10-20 mM (ad es., circa 10-18 mM, 10-16 mM, 10-15 mM, 12-20 mM, 14-18 mM, 14-16 mM). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia in modalità mista caricata (ad es., colonna HA) è lavata con un tampone di lavaggio avente una concentrazione di fosfato di o superiore a 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM.

L'eluizione da una colonna HA è tipicamente ottenuta con un gradiente di tampone fosfato. Ad esempio, un tampone di eluizione adatto può avere un gradiente di fosfato di sodio di circa 1-400 mM (ad es., 1-300 mM, 1-200 mM, 1-150 mM, 1-100 mM, 10-350 mM, 10-300 mM, 10-250 mM, 10-200 mM, 10-150 mM, 10-140 mM, 10-130 mM, 10-120 mM, 10-110 mM, 10-100 mM, 10-90 mM, 10-80 mM, 10-70 mM, 10-60 mM, 10-50 mM). In alcune forme di realizzazione, l'eluizione da una colonna HA è ottenuta aumentando gradualmente la concentrazione di fosfato nel tampone di eluizione. In alcune forme di realizzazione, i tamponi di eluizione graduale possono avere una concentrazione di fosfato selezionata tra 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. In alcune forme di realizzazione, l'eluizione da una colonna per cromatografia in modalità mista (ad es., colonna HA) è ottenuta mediante un tampone di eluizione avente una concentrazione di fosfato (ad es., fosfato di sodio) che varia da circa 50 mM a circa 150 mM (ad es., selezionata tra una concentrazione di fosfato (ad es., fosfato di sodio) di circa 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100

mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, e loro combinazioni).

Si apprezzerà che molte differenti combinazioni di condizioni per la cromatografia su HA sono note e possono essere usate per regolare i parametri per essere adatti per una particolare proteina di interesse (ad es., I2S ricombinante).

Cromatografia di interazione idrofoba

La cromatografia di interazione idrofoba (HIC) è una tecnica di separazione che usa le proprietà di idrofobicità per separare le proteine una dall'altra. In questo tipo di cromatografia, i gruppi idrofobi quali fenile, ottile o butile, sono attaccati alla colonna stazionaria. Le proteine che passano attraverso la colonna che hanno catene laterali amminoacidiche idrofobe sulla loro superficie sono in grado di interagire con e di legarsi ai gruppi idrofobi sulla colonna. Le colonne HIC sono note e includono, ad esempio, Phenyl Sepharose.

Le separazioni HIC sono spesso progettate usando condizioni opposte a quelle usate nella cromatografia a scambio ionico. In generale, un tampone con una elevata forza ionica, usualmente solfato di ammonio, è inizialmente applicato sulla colonna. Il sale nel tampone riduce la solvatazione dei soluti del campione pertanto man mano che la solvatazione si riduce, le regioni idrofobe che diventano esposte sono assorbite dal mezzo. La fase stazionaria è generalmente progettata per formare interazioni idrofobe con altre molecole. Queste interazioni sono generalmente troppo deboli in acqua, tuttavia l'aggiunta di sali (ad es., Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , e NaSCN) al tampone determina interazioni idrofobe. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile include una concentrazione salina da circa 0,1M a circa 3,0M, ad es., da circa 0,1M a circa 1,5M, da circa 0,2M a circa 0,8M, o da circa 0,3M a circa 0,5M.

In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile non è tamponata. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 14. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 10. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH da circa 5 a circa 7. In alcune forme di realizzazione, la fase mobile è tamponata a un pH di circa 5.0.

In alcune forme di realizzazione, una preparazione impura o un eluato intermedio o flusso passante è regolato a

una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,5 M a circa 2,0 M (ad es., circa 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, o 2,0 M) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa 4.5, 5.0, 5.5, o 6.0) prima del caricamento sulla colonna per cromatografia di interazione idrofoba (ad es., colonna contenente fenile). Una volta caricata una colonna per cromatografia di interazione idrofoba può essere lavata usando un tampone di lavaggio comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,5 M a circa 2,0 M (ad es., circa 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, o 2,0 M) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa 4.5, 5.0, 5.5, o 6.0). In alcune forme di realizzazione, la colonna per cromatografia di interazione idrofoba è eluita usando un tampone di eluzione comprendente una concentrazione salina (ad es., NaCl) che varia da circa 0,1 M a circa 0,5 M (ad es., circa 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, o 0,5 M) a pH di circa 4.5-6.0 (ad es., circa 4.5, 5.0, 5.5, o 6.0).

Caratterizzazione di proteine I2S purificate

La proteina I2S ricombinante purificata può essere caratterizzata usando diversi metodi.

Purezza

La purezza della proteina I2S ricombinante purificata è tipicamente misurata mediante il livello di diverse impurità (ad es., proteina della cellula ospite o DNA della cellula ospite) presenti nel prodotto finale. Ad esempio, il livello di proteina della cellula ospite (HCP) può essere misurato mediante ELISA o SDS-PAGE. Nella presente invenzione la proteina I2S ricombinante purificata contiene meno di 150 ng HCP/mg di proteina I2S (ad es., meno di 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 30, 20, 10 ng HCP/mg di proteina I2S). In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante purificata, quando sottoposta a SDS-PAGE con colorazione all'argento, non presenta nuove bande con intensità superiore allo 0,05%, 0,01%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, o allo 0,5% del controllo del saggio. Diversi controlli del saggio possono essere usati in particolare quelli accettabili dalle agenzie regolatrici quali FDA.

Attività specifica

Proteina I2S ricombinante purificata può anche essere caratterizzata valutando l'attività funzionale e/o biologica. L'attività enzimatica di una composizione di I2S ricombinante può essere determinata usando metodi noti nella

tecnica. Tipicamente i metodi implicano la rivelazione della rimozione del solfato da un substrato sintetico, che è noto come saggio di rilascio del solfato. Un esempio di un saggio dell'attività enzimatica implica l'uso di una cromatografia ionica. Questo metodo quantifica la quantità di ioni solfato che sono enzimaticamente rilasciati mediante I2S ricombinante da un substrato. Il substrato può essere un substrato naturale o un substrato sintetico. In alcuni casi, il substrato è eparina solfato (ad es., eparina disaccaride), dermatan solfato o un loro equivalente funzionale. Tipicamente, lo ione solfato rilasciato è analizzato mediante cromatografia ionica con un rivelatore di conduttività. In questo esempio, i risultati possono essere espressi come U/mg di proteina in cui 1 unità è definita come la quantità di enzima necessaria a rilasciare 1 μ mole di ione solfato all'ora dal substrato. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica, come misurata mediante il saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato, che varia da circa 0-100 U/mg, circa 10-100 U/mg, circa 10-80 U/mg, circa 20-80 U/mg, circa 20-70 U/mg, circa 20-60 U/mg, circa 20-50 U/mg, circa 30-100 U/mg, circa 30-90 U/mg, circa 30-80 U/mg, circa 30-70 U/mg, circa 30-60 U/mg, circa 40-100 U/mg, circa 40-90 U/mg, circa 40-80 U/mg, circa 40-70 U/mg, circa 40-60 U/mg. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica, come misurata mediante un saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato, di almeno circa 5 U/mg, circa 10 U/mg, circa 15 U/mg, circa 20 U/mg, circa 25 U/mg, circa 30 U/mg, circa 35 U/mg, circa 40 U/mg, circa 45 U/mg, circa 50 U/mg, circa 55 U/mg, circa 60 U/mg, circa 65 U/mg, circa 70 U/mg, circa 75 U/mg, circa 80 U/mg, circa 85 U/mg, circa 90 U/mg, circa 95 U/mg, o circa 100 U/mg. Condizioni esemplificative per eseguire il saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato sono forniti di seguito. Tipicamente, questo saggio misura la capacità di I2S di rilasciare ioni solfato da un substrato di origine naturale, eparina disaccaride. Il solfato rilasciato può essere quantificato mediante cromatografia ionica. In alcuni casi, la cromatografia ionica è dotata di un rivelatore di conduttività. Come esempio non limitativo, ai campioni è stato dapprima sostituito il tampone con acetato di Na 10 mM, pH 6 per rimuovere l'inibizione mediante ioni fosfato nel tampone di formulazione. I campioni sono quindi diluiti a 0,075 mg/ml con il tampone di reazione (acetato di Na 10 mM, pH 4.4) e incubati per 2 ore a 37°C con eparina

disaccaride a un rapporto enzima/substrato di 0,3 μg I2S/100 μg substrato in un volume di reazione di 30 μL . La reazione è quindi arrestata riscaldando i campioni a 100°C per 3 min. L'analisi è eseguita usando una colonna analitica Dionex IonPac AS18 con una pre-colonna IonPac AG18. È usato un metodo isocratico con idrossido di potassio 30 mM a 1,0 mL/min per 15 minuti. La quantità di solfato rilasciata dal campione di I2S è calcolata dall'analisi di regressione lineare degli standard di solfato nell'intervallo da 1,7 a 16,0 nmoli. Il valore riportabile è espresso come unità per mg di proteina, dove 1 unità è definita come 1 μmoli di solfato rilasciato per ora e la concentrazione proteica è determinata mediante misurazioni A280.

In alcune forme di realizzazione, l'attività enzimatica della proteina I2S ricombinante può anche essere determinata usando diversi altri metodi noti nella tecnica quale, ad esempio, il saggio 4-MUF che misura l'idrolisi di 4-metilumbelliferil-solfato in solfato e 4-metilumbelliferone naturalmente fluorescente (4-MUF). In alcune forme di realizzazione, un'attività enzimatica desiderata come misurato dal saggio 4-MUF *in vitro*, della proteina I2S ricombinante prodotta è almeno circa 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, o 20 U/mg. In alcune forme di realizzazione, un'attività enzimatica desiderata come misurata mediante il saggio 4-MUF *in vitro*, della proteina I2S ricombinante prodotta varia da circa 0-50 U/mg (ad es., circa 0-40 U/mg, circa 0-30 U/mg, circa 0-20 U/mg, circa 0-10 U/mg, circa 2-50 U/mg, circa 2-40 U/mg, circa 2-30 U/mg, circa 2-20 U/mg, circa 2-10 U/mg, circa 4-50 U/mg, circa 4-40 U/mg, circa 4-30 U/mg, circa 4-20 U/mg, circa 4-10 U/mg, circa 6-50 U/mg, circa 6-40 U/mg, circa 6-30 U/mg, circa 6-20 U/mg, circa 6-10 U/mg). Condizioni esemplificative per eseguire il saggio 4-MUF *in vitro* sono fornite di seguito. Tipicamente, un saggio 4-MUF misura la capacità di una proteina I2S di idrolizzare 4-metilumbelliferil-solfato (4-MUF-SO₄) in solfato e 4-metilumbelliferone naturalmente fluorescente (4-MUF). Una milliunità di attività è definita come la quantità di enzima necessaria a convertire una nanomole di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF in un minuto a 37°C. Tipicamente, le unità di fluorescenza media (MFU) generate dai campioni di test I2S con attività nota possono essere usate per generare una curva standard, che può essere usata per calcolare l'attività enzimatica di un campione di interesse. L'attività specifica può quindi essere calcolata dividendo l'attività enzimatica per la concentrazione proteica.

In ogni campione, la concentrazione proteica di una composizione I2S ricombinante può essere determinata mediante qualsiasi metodo adatto noto nella tecnica per determinare la concentrazione proteica. In alcuni casi, la concentrazione proteica è determinata mediante un saggio di assorbanza di luce ultravioletta. Tali saggi di assorbanza sono tipicamente condotti a una lunghezza d'onda di circa 280 nm (A_{280}).

Profilo di carica

I2S ricombinante purificata può essere caratterizzata dal profilo di carica associato alla proteina. Tipicamente, il profilo di carica proteico indica il pattern di cariche della catena laterale del residuo, tipicamente presente sulla superficie della proteina. Il profilo di carica può essere determinato eseguendo un saggio di cromatografia a scambio ionico (IEX) (ad es., HPLC) sulla proteina. In alcune forme di realizzazione, “profilo di carica” indica un gruppo di valori che rappresentano la quantità di proteina che eluisce da una colonna a scambio ionico a un punto temporale dopo l'aggiunta nella colonna di una fase mobile contenente uno ione di scambio.

Tipicamente, una colonna a scambio ionico adatta è una colonna a scambio anionico. Ad esempio, un profilo di carica può essere determinato mediante cromatografia a scambio anionico forte (SAX) usando un sistema di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). In generale, I2S ricombinante adsorbe sulla carica positiva fissa di una colonna a scambio anionico forte e un gradiente di forza ionica crescente usando una fase mobile a una portata predeterminata eluisce le specie di I2S ricombinante dalla colonna in proporzione alla forza della loro interazione ionica con la colonna a carica positiva. Le specie di I2S a carica più negativa (più acide) eluiscono più tardi rispetto alle specie I2S a carica meno negativa (meno acide). La concentrazione di proteine nell'eluato è rivelata mediante assorbanza di luce ultravioletta (a 280 nm).

In alcune forme di realizzazione, I2S ricombinante adsorbe a circa pH 8.0 in TRIS-HCl 20 mM sulla carica positiva fissa di una colonna Mini Q PE e un gradiente di forza ionica crescente usando una fase mobile costituita da TRIS-HCl 20 mM, cloruro di sodio 1 M, pH 8.0 a una portata di 0,8 ml/min eluisce le specie I2S ricombinante dalla colonna in proporzione alla forza della loro interazione ionica con la colonna a carica positiva.

In alcune forme di realizzazione, un profilo di carica può essere rappresentato da un cromatogramma di unità di

assorbanza rispetto al tempo dopo l'eluizione dalla colonna HPLC. Il cromatogramma può comprendere un gruppo di uno o più picchi con ciascun picco nel gruppo che identifica una sottopopolazione di I2S ricombinanti della composizione che hanno cariche di superficie simili.

In alcune forme di realizzazione, la composizione di proteina I2S purificata presenta almeno sei picchi nel suo profilo di carica. Un profilo di carica esemplificativo di I2S è rappresentato nella sezione degli esempi e in figura 11. Come mostrato in figura 11, sei picchi sono contrassegnati (da A ad F) nell'ordine della carica negativa crescente e contributo decrescente rispetto all'area di picco totale del cromatogramma. In alcune forme di realizzazione, il profilo di carica per una composizione di I2S ricombinante purificata contiene numero, dimensione, forma o intervallo temporale differenti di picchi in base alla quantità di cariche negative o positive sulla superficie della proteina. In alcune forme di realizzazione, una composizione di I2S ricombinante ha un profilo di carica che ha meno di 6 (ad es., meno di 5, 4, 3 o 2) picchi. In alcune forme di realizzazione, un profilo di carica di I2S ricombinante può avere 5, 4, 3, 2 o 1 picco(i). Ad esempio, qualsiasi uno, due, tre, quattro, o cinque tra i picchi A, B, C, D, E ed F può essere assente o ridotto in una composizione di proteina I2S ricombinante purificata. Tipicamente, un profilo di carica è considerato più omogeneo se vi sono meno picchi.

Mappatura dei glicani

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata può essere caratterizzata dalla sua composizione proteoglicanica, tipicamente definita mappatura dei glicani. Senza voler essere legati ad alcuna teoria, si ritiene che il legame glicanico insieme alla forma e alla complessità della struttura ramificata possa influenzare la clearance, il targeting lisosomiale, la biodisponibilità e/o l'efficacia *in vivo*.

Tipicamente, una mappa dei glicani può essere determinata mediante digestione enzimatica e successiva analisi cromatografica. Si possono usare diversi enzimi per la digestione enzimatica inclusi, senza limitazioni, glicosilasi, peptidasi (ad es., endopeptidasi, esopeptidasi), proteasi e fosfatasi adatte. In alcune forme di realizzazione, un enzima adatto è fosfatasi alcalina. In alcune forme di realizzazione, un enzima adatto è neuraminidasi. I glicani (ad es., fosfoglicani) possono essere rivelati mediante analisi cromatografica. Ad esempio, i fosfoglicani possono essere rivelati mediante cromatografia a scambio anionico ad alta prestazione

con rivelazione amperometrica pulsata (HPAE-PAD) o cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a esclusione sterica. La quantità di glicani (ad es., fosfoglicani) rappresentata da ciascun picco sulla mappa dei glicani può essere calcolata usando una curva standard di glicani (ad es., fosfoglicani) secondo i metodi noti nella tecnica e descritti nella presente.

In alcune forme di realizzazione, una I2S purificata secondo la presente invenzione presenta una mappa dei glicani comprendente sette gruppi di picchi indicativi di una proteina I2S neutra (gruppo di picchi 1), monosialilata (gruppo di picchi 2), di-sialilata (gruppo di picchi 3), monofosforilata (gruppo di picchi 4), tri-sialilata (gruppo di picchi 5), tetra-sialilata (gruppo di picchi 6), e disfosforilata (gruppo di picchi 7), rispettivamente. Le mappe dei glicani esemplificative di I2S sono rappresentate in figura 10. In alcune forme di realizzazione, una I2S ricombinante purificata ha una mappa dei glicani che ha meno di 7 gruppi di picchi (ad es., una mappa dei glicani con 6, 5, 4, 3, o 2 gruppi di picchi). In alcune forme di realizzazione, una I2S ricombinante purificata ha una mappa dei glicani che ha più di 7 gruppi di picchi (ad es., 8, 9, 10, 11, 12 o più).

La quantità relativa di glicani corrispondente a ciascun gruppo di picchi può essere determinata in base all'area del gruppo di picchi rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi in uno standard di riferimento predeterminato. In alcune forme di realizzazione, un gruppo di picchi 1 (neutro) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa il 40-120% (ad es., circa il 40-115%, circa il 40-110%, circa il 40-100%, circa il 45-120%, circa il 45-115%, circa il 45-110%, circa il 45-105%, circa il 45-100%, circa il 50-120%, circa il 50-110%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi in uno standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 2 (monosialilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa l'80-140% (ad es., circa l'80-135%, circa l'80-130%, circa l'80-125%, circa il 90-140%, circa il 90-135%, circa il 90-130%, circa il 90-120%, circa il 100-140%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 3 (disialilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa l'80-110% (ad es., circa l'80-105%, circa l'80-100%, circa l'85-105%, circa l'85-100%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 4 (monofosforilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa il

100-550% (ad es., circa il 100-525%, circa il 100-500%, circa il 100-450%, circa il 150-550%, circa il 150-500%, circa il 150-450%, circa il 200-550%, circa il 200-500%, circa il 200-450%, circa il 250-550%, circa il 250-500%, circa il 250-450%, o circa il 250-400%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 5 (trisialilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa il 70-110% (ad es., circa il 70-105%, circa il 70-100%, circa il 70-95%, circa il 70-90%, circa l'80-110%, circa l'80-105%, circa l'80-100%, o circa l'80-95%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 6 (tetra-sialilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa il 90-130% (ad es., circa il 90-125%, circa il 90-120%, circa il 90-115%, circa il 90-110%, circa il 100-130%, circa il 100-125%, o circa il 100-120%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. In alcune forme di realizzazione, il gruppo di picchi 7 (difosforilato) può avere l'area del gruppo di picchi che varia da circa il 70-130% (ad es., circa il 70-125%, circa il 70-120%, circa il 70-115%, circa il 70-110%, circa l'80-130%, circa l'80-125%, circa l'80-120%, circa l'80-115%, circa l'80-110%, circa il 90-130%, circa il 90-125%, circa il 90-120%, circa il 90-115%, circa il 90-110%) rispetto alla corrispondente area del gruppo di picchi nello standard di riferimento. Sono noti nella tecnica diversi standard di riferimento per la mappatura dei glicani e possono essere usati nel mettere in pratica della presente invenzione. Tipicamente, il gruppo di picchi 7 (difosforilato) corrisponde al livello di di-M6P sulla superficie della proteina I2S ricombinante purificata.

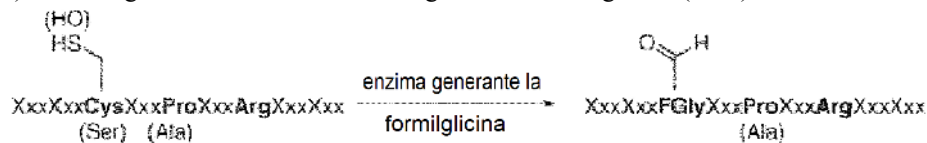
Si contempla che il pattern di glicosilazione di una I2S purificata influenzi il targeting di lisosomiale. Sono noti nella tecnica diversi saggi di assorbimento cellulare *in vitro* e possono essere usati per mettere in pratica la presente invenzione. Ad esempio, per valutare l'assorbimento di I2S mediante i recettori M6P sono eseguiti saggi di assorbimento cellulare usando fibroblasti umani che esprimono i recettori di M6P sulla loro superficie. La quantità internalizzata di I2S può essere misurata mediante un metodo ELISA. In alcune forme di realizzazione, la proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione è caratterizzata dall'assorbimento cellulare superiore al 70%, 75%, all'80%, 85%, al 90%, 95%, come determinato mediante un saggio di assorbimento *in vitro*.

Mappatura peptidica

In alcune forme di realizzazione, la mappatura peptidica può essere usata per caratterizzare la composizione amminoacidica, le modificazioni post-traduzionali e/o il processamento cellulare; quale taglio di un peptide segnale, conversione in formilglicina e/o glicosilazione. Tipicamente, una proteina ricombinante può essere scomposta in frammenti peptidici discreti, attraverso scomposizione controllata o casuale, per produrre un pattern o mappa peptidica. In alcuni casi, una proteina I2S purificata può essere dapprima sottoposta a digestione enzimatica prima dell'analisi analitica. La digestione può essere eseguita usando una peptidasi, glicoside idrolasi, fosfatasi, lipasi o proteasi e/o loro combinazioni prima dell'analisi analitica. La composizione strutturale dei peptidi può essere determinata usando metodi ben noti nella tecnica. Metodi esemplificativi includono, senza limitazioni, spettrometria di massa, risonanza magnetica nucleare (NMR) o HPLC.

Percentuale di conversione in formilglicina

La mappatura peptidica può essere usata per determinare la percentuale di conversione in FGly. Come sopra descritto, l'attivazione di I2S richiede la conversione della cisteina (corrispondente alla posizione 59 della I2S umana matura) in formilglicina mediante un enzima generante formilglicina (FGE) come mostrato di seguito:



Pertanto, la percentuale di conversione in formilglicina (%FG) può essere calcolata usando la seguente formula:

$$\%FG \text{ (di DS)} = \frac{\text{Numero di molecole di I2S attive}}{\text{Numero di molecole di I2S totali (attive+inattive)}} \times 100$$

Per calcolare %FG, una proteina I2S ricombinante può essere digerita in peptidi corti usando una proteasi (ad es., tripsina o chimotripsina). I peptidi corti possono essere separati e caratterizzati usando ad es., cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a esclusione sterica. Il peptide contenente la posizione corrispondente la posizione 59 della I2S umana matura può essere caratterizzato per determinare se Cys in posizione 59 è stata convertita in una FGly rispetto a un controllo (ad es., una proteina I2S senza conversione in FGly o una proteina I2S con il 100% di conversione in FGly). La quantità di peptidi contenenti FGly (corrispondente al numero di

molecole di I2S attive) e la quantità totale di peptidi sia con FGly sia Cys (corrispondente al numero di molecole di I2S totali) possono essere determinate in base alle corrispondenti aree di picchi e può essere calcolato il rapporto indicante la %FG.

Una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione ha almeno il 70% (ad es., almeno circa il 77%, l'80%, 85%, il 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) di conversione del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di I2S umana (SEQ ID NO:1) in C_α-formilglicina (FGly). In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata secondo la presente invenzione ha una conversione sostanzialmente del 100% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di I2S umana (SEQ ID NO:1) in C_α-formilglicina (FGly).

Contenuto di acido sialico

In alcune forme di realizzazione, una proteina I2S ricombinante purificata può essere caratterizzata dalla sua composizione di acido sialico. Senza voler essere legati alla teoria, si contempla che i residui acido sialico sulle proteine possano prevenire, ridurre o inibire la loro rapida clearance *in vivo* attraverso i recettori della asialoglicoproteina che sono presenti sugli epatociti. Pertanto, si ritiene che le proteine ricombinanti che hanno un contenuto di acido sialico relativamente elevato tipicamente abbiano un tempo in circolazione relativamente lungo *in vivo*.

In alcune forme di realizzazione, il contenuto di acido sialico di una proteina I2S ricombinante purificata può essere determinato usando metodi ben noti nella tecnica. Ad esempio, il contenuto di acido sialico di una proteina I2S ricombinante può essere determinato mediante digestione enzimatica e successiva analisi cromatografica. La digestione enzimatica può essere realizzata usando qualsiasi sialidasi adatta. In alcuni casi, la digestione è eseguita mediante un enzima glicoside idrolasi, quale neuraminidasi. L'acido sialico può essere rivelato mediante analisi cromatografica quale, ad esempio, cromatografia a scambio anionico ad alta prestazione con rivelazione amperometrica pulsata (HPAE-PAD). La quantità di acido sialico in una composizione di I2S ricombinante può essere calcolata usando una curva standard di acido sialico, secondo i metodi noti nella tecnica e descritti nella presente.

In alcune forme di realizzazione, il contenuto di acido sialico di una proteina I2S ricombinante purificata può

essere superiore a 16 mol/mol. L'unità "mol/mol" nel contesto del contenuto di acido sialico indica le moli di residuo di acido sialico per mole di enzima. In alcuni casi, il contenuto di acido sialico di una proteina I2S ricombinante è superiore a circa 16,5 mol/mol, circa 17 mol/mol, circa 18 mol/mol, circa 19 mol/mol, circa 20 mol/mol, circa 21 mol/mol, circa 22 mol/mol o più. In alcune forme di realizzazione, il contenuto di acido sialico di una proteina I2S ricombinante purificata può essere in un intervallo tra circa 16-20 mol/mol, 16-21 mol/mol, circa 16-22 mol/mol, 16-23 mol/mol, 16-24 mol/mol, circa 16-25 mol/mol, circa 17-20 mol/mol, 17-21 mol/mol, circa 17-22 mol/mol, 17-23 mol/mol, 17-24 mol/mol, o circa 17-25 mol/mol.

Composizione farmaceutica e somministrazione

La proteina I2S ricombinante purificata può essere somministrata a un paziente con sindrome di Hunter secondo i metodi noti. Ad esempio, la proteina I2S ricombinante purificata può essere rilasciata per via endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, parenterale, transdermica, o transmucosale (ad es., orale o nasale).

In alcune forme di realizzazione, una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa è somministrata a un individuo mediante somministrazione endovenosa.

In alcune forme di realizzazione, una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa è somministrata a un individuo mediante somministrazione intratecale. Come usata nella presente, l'espressione "somministrazione intratecale" o "iniezione intratecale" indica una iniezione nel canale spinale (spazio intratecale circondante il midollo spinale). Si possono usare diverse tecniche incluse, senza limitazioni, iniezione cerebroventricolare laterale attraverso una trapanazione neurochirurgica o puntura cisternale o lombare o simili.

In alcune forme di realizzazione, "somministrazione intratecale" o "rilascio intratecale" secondo la presente invenzione indica la somministrazione o il rilascio IT attraverso l'area o regione lombare ovvero una somministrazione o rilascio IT lombare. Come usata nella presente, l'espressione "regione lombare" o "area lombare" indica l'area tra la terza e la quarta vertebra lombare (parte inferiore della schiena) più precisamente, la regione L2-S1 della colonna vertebrale.

In alcune forme di realizzazione, una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa è somministrata all'individuo mediante somministrazione sottocutanea (ovvero, sotto la cute). A tale scopo, la

formulazione può essere iniettata usando una siringa. Tuttavia, altri dispositivi per la somministrazione della formulazione sono disponibili quali dispositivi di iniezione (ad es., dispositivi Inject-ease™ e Genject™); penne iniettori (quali GenPen™); dispositivi senza ago (ad es., MediJector™ e BioJector™); e sistemi di rilascio cerotto sottocutaneo.

In alcune forme di realizzazione, la somministrazione intratecale può essere usata in associazione ad altre vie di somministrazione (ad es., endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, parenterale, transdermica, o transmucosale (*ad es.*, orale o nasale)).

La presente invenzione contempla singole nonché molteplici somministrazioni di una quantità terapeuticamente efficace di una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa descritta nella presente.

Una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa può essere somministrata a intervalli regolari in base alla natura, alla gravità e all'entità della condizione dell'individuo (ad es., una malattia di accumulo lisosomiale). In alcune forme di realizzazione, una quantità terapeuticamente efficace di una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa può essere somministrata periodicamente a intervalli regolari (ad es., una volta all'anno, una volta ogni sei mesi, una volta ogni cinque mesi, una volta ogni tre mesi, bimensilmente (una volta ogni due mesi), mensilmente (una volta al mese), bisettimanalmente (una volta ogni due settimane), settimanalmente, quotidianamente o continuamente).

Una I2S ricombinante o una composizione farmaceutica contenente la stessa può essere formulata con un veicolante o eccipiente fisiologicamente accettabile per preparare una composizione farmaceutica. Il veicolante e l'agente terapeutico possono essere sterili. La formulazione dovrebbe essere adatta per la modalità di somministrazione.

Veicolanti farmaceuticamente accettabili adatti includono, ma senza limitazioni ad acqua, soluzioni di sale (*ad es.*, NaCl), soluzione salina, soluzione salina tamponata, alcoli, glicerolo, etanolo, gomma arabica, oli vegetali, benzil alcoli, glicoli polietilenici, gelatina, carboidrati quali lattosio, amilosio o amido, zuccheri quali mannitolo, saccarosio, o altri, destrosio, stearato di magnesio, talco, acido silicico, paraffina viscosa, oli profumati, esteri di acido grasso, idrossimetilcellulosa, polivinil pirrolidone, *ecc.*, nonché loro combinazioni. Le preparazioni

farmaceutiche possono, se desiderato, essere miscelate con agenti ausiliari (*ad es.*, lubrificanti, conservanti, stabilizzanti, agenti umettanti, emulsionanti, sali per influenzare la pressione osmotica, tamponi, coloranti, sostanze aromatizzanti e/o aromatiche, e simili) che non reagiscono in modo nocivo con i composti attivi o interferiscono con la loro attività. In alcune forme di realizzazione, è usato un veicolante idrosolubile adatto per la somministrazione endovenosa.

La composizione o farmaco, se desiderato, può anche contenere minori quantità di agenti umettanti o emulsionanti, o agenti tampone del pH. La composizione può essere una soluzione, sospensione, emulsione liquida, compressa, pillola, capsula, formulazione a rilascio sostenuto, o polvere. La composizione può anche essere formulata come supposta, con leganti e veicolanti tradizionali quali trigliceridi. La formulazione orale può includere veicolanti standard quali qualità farmaceutiche di mannitolo, lattosio, amido, stearato di magnesio, polivinil pirrolidone, saccarina sodica, cellulosa, carbonato di magnesio, *ecc.*

La composizione o farmaco può essere formulata secondo le procedure abituali come composizione farmaceutica adatta per la somministrazione agli esseri umani. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, una composizione per la somministrazione endovenosa tipicamente è una soluzione in tampone acquoso isotonicamente sterile. Se necessario, la composizione può anche includere un agente solubilizzante e un anestetico locale per attenuare il dolore nel sito dell'iniezione. Generalmente, gli ingredienti sono forniti separatamente o miscelati insieme in una forma di dosaggio unitaria, ad esempio, come polvere liofilizzata secca o concentrato privo d'acqua in un contenitore ermeticamente sigillato quale un'ampolla o bustine indicanti la quantità di agente attivo. Quando la composizione deve essere somministrata mediante infusione, può essere distribuita con un flacone di infusione contenente acqua di qualità farmaceutica sterile, soluzione salina o destrosio/acqua. Quando la composizione è somministrata mediante iniezione, un'ampolla di acqua sterile per iniezione o soluzione salina può essere fornita in modo che gli ingredienti possano essere miscelati prima della somministrazione.

Come usata nella presente, l'espressione "quantità terapeuticamente efficace" è ampiamente determinata in base alla quantità totale dell'agente terapeutico contenuto nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione. Generalmente, una quantità terapeuticamente efficace è sufficiente a ottenere un beneficio

significativo per l'individuo (ad es., trattare, modulare, curare, prevenire e/o migliorare la malattia o condizione sottostante). Ad esempio, una quantità terapeuticamente efficace può essere una quantità sufficiente a ottenere un effetto terapeutico e/o profilattico desiderato quale una quantità sufficiente a modulare i recettori dell'enzima lisosomiale o la loro attività per trattare così tale malattia di accumulo lisosomiale o i suoi sintomi (ad es., una riduzione o eliminazione della presenza o incidenza di "corpi zebrati" o vacuolizzazione cellulare dopo la somministrazione delle composizioni della presente invenzione a un individuo). Generalmente, la quantità di un agente terapeutico (ad es., un enzima lisosomiale ricombinante) somministrato a un individuo che ne necessita dipenderà dalle caratteristiche dell'individuo. Tali caratteristiche includono la condizione, la gravità della malattia, la salute generale, l'età, il sesso, e il peso corporeo dell'individuo. Un comune esperto nella tecnica sarà facilmente in grado di determinare i dosaggi adatti in base a questi e ad altri fattori attinenti. Inoltre, saggi obiettivi e soggettivi possono opzionalmente essere usati per identificare intervalli di dosaggio ottimali.

Una quantità terapeuticamente efficace è comunemente somministrata in un regime di dosaggio che può comprendere più dosi unitarie. Per qualsiasi particolare proteina terapeutica, una quantità terapeuticamente efficace (e/o una dose unitaria adatta in un regime di dosaggio efficace) può variare, ad esempio, in base alla via di somministrazione, sulla combinazione con altri agenti farmaceutici. Inoltre, la quantità terapeuticamente efficace specifica (e/o dose unitaria) per qualsiasi particolare paziente può dipendere da numerosi fattori inclusi il disturbo trattato e la gravità del disturbo; l'attività dell'agente farmaceutico specifico impiegato; la composizione specifica impiegata; l'età, il peso corporeo, la salute generale, il sesso e la dieta del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione e/o la velocità di escrezione o metabolismo della proteina di fusione specifica impiegata; la durata del trattamento; e fattori simili come è ben noto nelle tecniche mediche.

Le composizioni farmaceutiche esemplificative addizionali e i metodi di somministrazione sono descritti nella pubblicazione PCT WO2011/163649 intitolata "Methods and Compositions for CNS Delivery of Iduronate-2-Sulfatase"; e la domanda provvisoria no. di serie 61/618.638 intitolata "Subcutaneous administration of iduronate 2 sulfatase" depositata il 30 marzo, 2012.

Si deve inoltre comprendere che per qualsiasi particolare individuo, i regimi di dosaggio specifici dovrebbero

essere regolati nel tempo secondo la necessità dell'individuo e il giudizio professionale della persona che somministra o supervisiona la somministrazione della terapia sostitutiva enzimatica e che gli intervalli di dosaggio esposti nella presente sono soltanto esemplificativi e non intendono limitare l'oggetto o l'uso dell'invenzione rivendicata.

ESEMPI

Esempio 1: cattura di I2S AF ricombinante e procedimento di purificazione

Questo esempio dimostra che può essere usato un procedimento di purificazione a valle semplificato per catturare e purificare I2S ricombinante prodotta in terreno privo di siero. Uno schema di purificazione esemplificativo è rappresentato in figura 1.

È stata sviluppata una linea cellulare che esprime in modo stabile un enzima iduronato-2-solfatasi (I2S) ed enzima generante formilglicina (FGE). La generazione e la caratterizzazione delle linee cellulari esemplificative sono descritte nella domanda provvisoria U.S. intitolata "Cells for Producing Recombinant Iduronate-2-Sulfatase". In breve una linea cellulare umana è stata ingegnerizzata per coesprimere la proteina I2S umana con la sequenza amminoacidica mostrata in SEQ ID NO:2 e l'enzima generante la formilglicina umana (FGE) con la sequenza amminoacidica mostrata in SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO: 2

> Iduronato 2-solfatasi precursore a lunghezza completa

```
MPPRPTGRGLLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDK
LVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAG
NFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSEKYENTKTCR
GPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPH
IPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP
PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGVALGEHGEW
AKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVE
LVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPREL
IAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVVWGFNPDEFLANFSDIHA
GELYFVDSPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
```

SEQ ID NO: 5

Precursore di FGE umana a lunghezza completa:

MAAPALGLVCGRCPGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQ
RPGAHGSSAAAHRYREANAPGPVGERQLAHSKMVPVPIAGVFTMGTDQPQIKQDG
EAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEKFNSTGYL TEAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTN
IQQAVAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGK
RLPTEAEWEYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGT
APVDAFPPNGYGLYNIVGNAWEWTSDWWTVVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGS
YMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

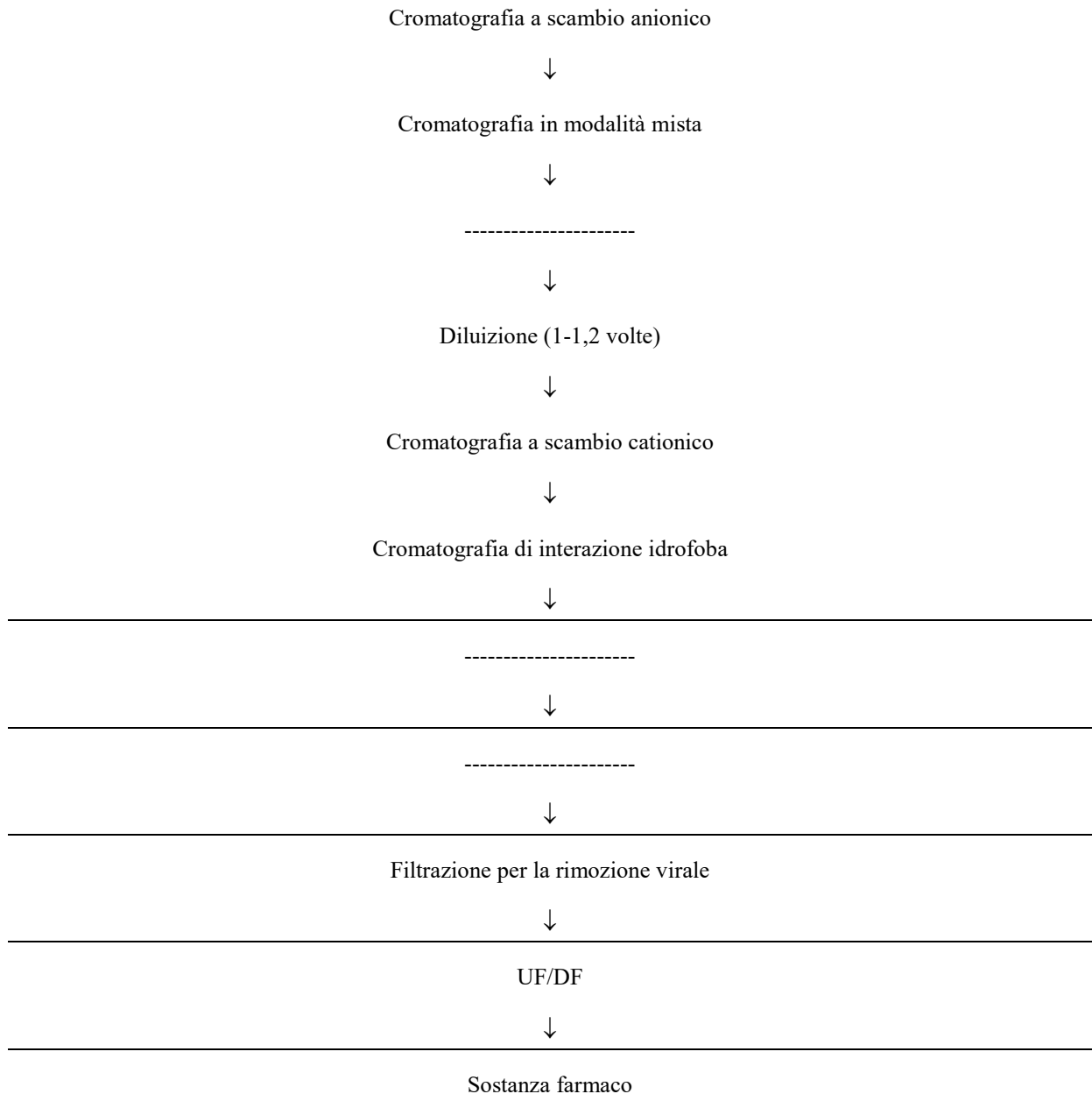
Dopo sintesi dell'enzima I2S a lunghezza completa, il peptide segnale di 25 amminoacidi è rimosso e un enzima I2S maturo solubile è secreto dalla cellula.

Un terreno chimicamente definito (privo di siero/privo di componenti di origine animale; AF) è stato usato nel procedimento in bioreattore.

Il materiale di raccolto individuale è stato ridotto in volume e il tampone è stato sostituito attraverso un procedimento di ultrafiltrazione/diafiltrazione. Il materiale, definito bulk non purificato (UPB), è stato congelato a -50°C per il raccolto individuale. Il procedimento di purificazione a valle è iniziato con lo scongelamento e il pool del bulk non purificato e includeva la successiva inattivazione virale, e i passaggi di cromatografia a scambio anionico (Capto Q), in modalità mista (idrossiapatite ceramica), scambio cationico (SP Sepharose) e di interazione idrofoba (Phenyl Sepharose) seguite dalla filtrazione virale e concentrazione finale e passaggio di diafiltrazione. In particolare, questo procedimento di purificazione usava le modalità cromatografiche Q, idrossiapatite, SP e con fenile. La cromatografia con proteina G e la cromatografia a esclusione sterica tradizionalmente usate nel procedimento di purificazione di I2S sono state eliminate. Le fasi esemplificative sono mostrate in tabella 3.

Tabella 3: Fasi esemplificative del procedimento di purificazione

Raccolto
UF/DF
Conservazione congelamento
Scongelamento, pool e filtrazione profonda
↓
Inattivazione virale con solvente/detergente
↓



La proteina I2S purificata è stata valutata per la purezza mediante mappatura peptidica, SDS-PAGE (argento), HPLC ad esclusione sterica. L'attività enzima specifica, il contenuto di formilglicina, il contenuto di acido sialico, la mappa dei glicani, i profili di carica sono stati determinati usando metodi standard. Risultati semplificativi sono mostrati in tabella 4.

Tabella 4: Analisi della proteina I2S ricombinante purificata

Saggio		I2S purificata (scala 10 L) Min-Max (n)
Mappatura peptidica	L1	100-105% (n=3)
	L10	98-100% (n=3)
	L12	102-102% (n=3)
	L13	96-97% (n=3)
	L14	102-103% (n=3)
	L17	101-101% (n=3)
	L20	102-103% (n=3)
Proteina della cellula ospite		≤62,5 (n=5)
SDS-PAGE (argento)		Conforme
HPLC a scambio ionico	%Picco A	69-69% (n=2)
	%Picco B	20-21% (n=2)
	%Picco E+F	10-11% (n=2)
HPLC a esclusione sterica		99,9-99,9% (n=5)
Assorbimento cellulare (Biosaggio)		85, 95% e 97% (n=3)
% Formilglicina		87-95% (n=5)
Attività specifica		62-78 (n=5)
Mappa dei glicani	Gruppo di picchi 3	88-93% (n=5)
	Gruppo di picchi 5	72-110% (n=5)
	Gruppo di picchi 6	124-133% (n=5)
	Gruppo di picchi 7	78-87% (n=5)
	Area totale	94-116% (n=5)
Acido sialico		16-22 (n=4)
Endotossina		<0,04-<0,05 (n=2)

Biocarico		0,00-0,00 (n=2)
-----------	--	-----------------

Una mappa peptidica esemplificativa paragonata a un riferimento I2S disponibile in commercio è mostrata in Figura 2. I risultati dell'analisi SDS-PAGE (argento) esemplificativa sono mostrati in Figura 3. Tipicamente, usando un procedimento descritto nella presente, la concentrazione di HCP della sostanza farmaco (DS) era <100 ppm, che soddisfa la specificazione <100 ppm richiesta in molti mercati inclusi gli US. SEC di DS era $\geq 99,5\%$, che soddisfa anche l'attuale specifica dei requisiti >99,3% commerciale in molti mercati. Il profilo di carica esemplificativo è mostrato in Figura 4. La mappa dei glicani esemplificativa è mostrata in Figura 5. In particolare, la mappa dei glicani di I2S purificata include sette gruppi di picchi, che eluiscono secondo una quantità crescente di cariche negative derivate dall'acido sialico e i residui mannosio-6-fosfato, che rappresentano nell'ordine di eluizione, i glicani neutri, mono, disialilati, monofosforilati, trisialilati e ibridi (M6P monosialilati e di capping), tetrasialilati e ibridi (M6P disialilati e di capping) e difosforilati.

Complessivamente, questo esempio dimostra che un procedimento di purificazione a quattro colonne semplificato può essere usato per purificare con successo I2S ricombinante prodotta in terreno privo di componenti animali su ampia scala.

Esempio 2: studi di stabilità del raccolto e inattivazione virale di I2S AF ricombinante

L'oggetto del presente studio era di valutare gli effetti della temperatura nel tempo di mantenimento e cicli congelamento-scongelo sulla stabilità del raccolto chiarificato di I2S ricombinante.

I campioni di raccolto chiarificato sono stati conservati a temperatura ambiente e 2-8°C per un periodo fino a sette giorni e i campioni UPB inattivati virali sono stati mantenuti a temperatura ambiente fino a 24 ore. I campioni congelati-scongelo sui campioni chiarificati sono stati congelati a -20°C, -50°C e -80°C ed erano sottoposti a congelamento-scongelo fino a tre cicli. La stabilità è stata valutata usando Western blot, SEC HPLC, e saggio di attività.

Il materiale raccolto I2S-AF è stato prodotto dalla linea cellulare 2D mediante CCPD usando un bioreattore da 20L B. Braun con un dispositivo di ritenzione centrifuga e una velocità di spurgo desiderata. Per lo studio di mantenimento della temperatura, ciascun raccolto chiarificato è stato conservato a temperatura ambiente a 2-8°C

e campionato a tempi di mantenimento selezionato. Le quantità di campionamento e i tempi di mantenimento sono elencati in tabella 5. I campioni congelati-scongelati sono stati conservati a -20°C, -50°C e -80°C e scongelati usando un bagno d'acqua a 25°C.

Tabella 5. Stabilità del punto di mantenimento del raccolto chiarificato

	Campioni	Temperatura di mantenimento	Tempo di mantenimento (giorni)
Raccolto chiarificato 12	15 x 0,5 mL	2-8°C	T=0, 24ore, 76ore, 120ore, 168ore
	15 x 0,5 mL	Ambiente	T=0, 24ore, 76ore, 120ore, 168ore
	9 x 0,5 mL	-20°C, -50°C, e -80°C	congelamento/scongelamento 1, 2, e 3
Raccolto chiarificato 18	15 x 0,5 mL	2-8°C	T=0, 24ore, 76ore, 120ore, 168ore
	15 x 0,5 mL	Ambiente	T=0, 24ore, 76ore, 120ore, 168ore
	9 x 0,5 mL	-20°C, -50°C, e -80°C	congelamento/scongelamento 1, 2, e 3

Il passaggio di inattivazione virale è avvenuto al passaggio di bulk non purificato prima del caricamento della prima colonna. UPB è stato prodotto concentrando e sostituendo il tampone del raccolto chiarificato. UF/DF è stata eseguita usando un sistema Pall 1 sq. ft. Centrimate e il tampone sostituito con MES 10 mM, NaCl 155 mM, pH=6.5. Nel passaggio di inattivazione virale è stato addizionato Tween 80 all'1% e TnBP allo 0,3%, filtrato usando filtri siringa Durapore per ciascun punto temporale. I campioni sono stati prelevati a ciascun punto temporale elencato in tabella 6 e congelati a -80°C. I campioni dagli studi del punto di mantenimento e congelamento/scongelamento del raccolto chiarificato sono stati testati mediante Western blot e l'attività (saggio di 4-MU). I campioni UPB dell'inattivazione virale sono stati testati per la purezza mediante SEC HPLC. I risultati dell'attività del punto di mantenimento del raccolto 12 e 18 sulla tabella 5 non mostravano variazioni significative fino a 7 giorni di conservazione a temperatura ambiente e 2-8°C per entrambi i raccolti. Non sono state osservate variazioni significative nell'attività del raccolto 12 fino a 3 cicli di congelamento-scongelamento

conservati a -20°C, -50°C, e -80°C.

Tabella 6. Inattivazione virale del bulk non purificato

	Campioni	Temperatura di mantenimento	Tempo di mantenimento (giorni)
Inattivazione virale	9 x 0,5 mL	Ambiente, Controllo	T=0, 6ore, 24ore
	9 x 0,5 mL	Ambiente, inattivazione virale	T=0, 6ore, 24ore

L'attività e SEC-HPLC per la stabilità del passaggio UPB di inattivazione virale sono descritti nelle figure 6 e 7. Ciò dimostra che non vi erano problemi nella stabilità di inattivazione virale in base all'attività e alla purezza fino a 24 ore.

In breve, in base all'analisi di stabilità descritta nella presente, il raccolto chiarificato può essere conservato a 2-8°C (ad esempio, fino a 7 giorni) senza variazioni significative della qualità del raccolto. I raccolti chiarificati possono essere sottoposti a più cicli di congelamento-scongelo e conservati a temperature di -20°C, -50°C, e -80°C senza variazioni significative della stabilità. In base a risultati di purezza mediante SEC-HPLC, l'inattivazione virale nel passaggio UPB può avvenire a temperatura ambiente (ad es., fino a 24 ore) con nessuna variazione dell'attività e della purezza.

Esempio 3: purificazione e analisi del ciclo di conferma del terreno IL CD privo di componenti animali

L'obiettivo di questo studio era eseguire la purificazione dal raccolto riunito di I2S-AF prodotta in una perfusione priva di componenti animali usando terreno chimicamente definito e caratterizzare la sostanza farmaco.

Questo studio valutava la prestazione del procedimento di purificazione di I2S-AF e la sostanza farmaco (DS) prodotta da un bioreattore con terreno chimicamente definito.

Coltura cellulare

Il materiale I2S-AF è stato prodotto da una linea cellulare 2D che esprime I2S e l'enzima generante formilglucina (FGE)) come descritto nell'esempio 1. Il materiale è stato prodotto in CCPD in un bioreattore rotante con filtro per centrifuga Das Gip da 1L usando un terreno privo di siero chimicamente definito. Le singole sacche di

ciascun raccolto chiarificato (HI-21) sono state ricevute congelate a -20°C e scongelate a 2-8°C tutta la notte. Uguali volumi di ciascun raccolto chiarificato sono stati riuniti per rappresentare un pool di raccolto intero, quindi 0,2 µm sono stati filtrati e concentrati usando una cassetta 30 kD Pall Omega Centramate con un'area di membrana totale di 1 ft². Il bulk non purificato (UPB) è stato filtrato a 0,2 µm e congelato prima dell'uso.

Purificazione

Le caratteristiche e il caricamento della colonna esemplificativa sono descritte in tabella 7. Q Sepharose è stato caricato a un target di 3 g/L mediante titolo. Le successive colonne sono state caricate al 100% da una precedente eluizione di colonna e nessun materiale è stato rimosso.

Tabella 7. Caratteristiche di colonna e carico

Colonna	Dimensioni della colonna (cm x cm)	Volume della colonna (mL)	Carico della colonna (g/L di resina per I2S)	Carico della colonna (mg)
Q Sepharose	2,6 x 25	133	3	399
HA Tipo II, 80 µm	1,6 x 30	60	5,5	330
Fenil Sepharose	1,6 x 23	46	5,6	258

Un ciclo di purificazione è stato eseguito usando UPB del pool dei raccolti 1-21 dal bioreattore. UPB è stato scongelato a 2-8°C tutta la notte e riunito in uguale volume da ciascun raccolto.

Singoli passaggi di trattamento della colonna e formulazioni del tampone si possono trovare nelle tabelle 8-11. UPB riunito è stato filtrato usando un sistema a filtro in flaconi 0,2 µm, regolati a pH 6.5 usando acetato di sodio 1 M e la conduttività regolata a 16 mS/cm con cloruro di sodio 5 M prima del caricamento sulla colonna Q Sepharose FF. L'eluizione di Q Sepharose è stata regolata a NaPO₄ 0,001 M usando NaPO₄ 0,25M pH 5.5 e filtrata attraverso un filtro nella parte superiore del flacone PES 0,22 µm prima del caricamento sulla colonna HA. La conduttività dell'eluizione HA è stata regolata a NaCl 1,55 M con NaCl 5 M e pH regolato a pH 5.5 con acetato di sodio 1 M. Il tempo di regolamento è stato approssimativamente di 1 ora. Il pool regolato è stato filtrato usando un filtro sulla parte superiore del flacone di PES 0,22 µm prima del caricamento sulla colonna Phenyl Sepharose. L'eluizione su fenile è stata concentrata 4X e diafiltrata 6X in NaPO₄ 0,02 M, NaCl 0,137 M,

pH 6.0. Il prodotto diafiltrato è stato regolato a 2,0 g/L e formulato con polisorbato 20 allo 0,2% per generare la sostanza farmaco simulata. Un pool simulato di H1-20 del DS è stato creato per la caratterizzazione addizionale.

Tabella 8. Dettagli del procedimento esemplificativo per la cromatografia Q Sepharose FF

Passaggi del procedimento	Portata (cm/ora)	CV	Tamponi
Sterilizzazione	150	3	NaOH 0,5 N
Equilibratura	150	4	MES 0,01 M, NaCO ₃ 0,155 M l, pH 6.5
Lavaggio 1	150	2	MES 0,01 M, NaCl 0,155 M, pH 6.5
Lavaggio 2	150	3	MES 0,01 M, NaCl 0,155 M, pH 5.5
Eluizione	150	3	MES 0,01 M, NaCl 0,50 M, pH 5.5
Purificazione/Strippaggio	150	4	NaOH 1,0 M, NaCl 2 M
Conservazione	150	4	NaOH 0,0 N

Tabella 9. Dettagli del procedimento esemplificativo per la cromatografia con HA

Passaggi del procedimento	Portata (cm/ora)	CV	Tamponi
Sterilizzazione	200	3	NaOH 0,5 N
Carica	200	3	NaPO ₄ 0,250 M pH 5.5
Equilibratura	200	3-6	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,001M, NaCl 0,5M, pH 5.5
Lavaggio 1	200	1	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,001M, NaCl 0,5M, pH 5.5
Lavaggio 2	200	6	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,01M, NaCl 0,5M, pH 5.5
Eluizione	200	3	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,08M, pH 5.5
Strippaggio	200	4	NaPO ₄ 0,4M, pH 12
Purificazione	200	4	NaOH 0,5 N
Conservazione	200	4	NaOH 0,1 N

Tabella 10. Dettagli del procedimento esemplificativo per la cromatografia Phenyl Sepharose

Passaggi del procedimento	Portata (cm/ora)	CV	Tamponi
Sterilizzazione	150	3	NaOH 0,5 N
Equilibratura	150	4-6	MES 0,02 M, NaCl 1,5 M, pH 5.5
Lavaggio	150	2	MES 0,02 M, NaCl 1,5 M, pH 5.5
Eluizione	150	3	MES 0,02 M, NaCl 0,2 M, pH 5.5
Lavaggio con acqua	150	3	Acqua RO/DI
Lavaggio con etanolo	150	3	Etanolo al 20%
Purificazione	150	3	NaOH 0,5 N
Conservazione	150	3	NaOH 0,01 N

Tabella 11. Diafiltrazione esemplificativa del pool di eluizione con fenile

Unità di filtrazione	Centricon Plus 70
Tampone di diafiltrazione	NaPO ₄ 0,02 M, NaCl 0,137 M, pH 6.0
Volumi di diafiltrazione	6X-8X

Purezza durante il procedimento per HCP mediante ELISA

La tabella 12 descrive rimozione di HOP (HCP) durante il procedimento per ciascun passaggio. I risultati di HCP durante il procedimento erano elevati con la maggiore rimozione nel passaggio con HA.

Tabella 12. Rimozione di HCP durante il procedimento

Fase	HCP (ng/mg)	LRV	Volte HCP
Q	46,392	0,3	2
	51,957		
HA	51,957	1,3	18
	5,876		
Fenile	5,876	0,7	5
	1,870		

Caratterizzazione della sostanza farmaco

Risultati di rilascio del lotto di sostanza farmaco esemplificativi sono elencati in tabella 13. Come si può osservare, la sostanza farmaco aveva un'elevata attività specifica e % FG nel materiale purificato. Caratterizzazione delle qualità del farmaco esemplificativo è mostrata nella tabella 13. HCP era ridotta da 1,870 ng/mg a 372 ng/mg nel passaggio UF/DF finale.

Tabella 13. Rilascio del lotto di sostanza farmaco esemplificativo

Rilascio lotto di DS	Terreno CD 1L (I2S-AF)
%FG	94%
Mappa dei glicani	
Gruppo 3	99%
Gruppo 5	89%
Gruppo 6	104%
Gruppo 7 (2-M6P)	95%
Area totale	107%
Acido sialico	17
Internalizzazione	83%
SEC-HPLC	99,9%
Attività specifica (U/mg)	82
IEX HPLC	
A (%)	64%
B (%)	23%
A+B	87%
E+F	0%
Proteina della cellula ospite	372
Assorbimento cellulare	98

Esempio 4. Caratterizzazione fisicochimica e biologica dell'enzima I2S ricombinante purificato

Lo scopo dell'esempio era di eseguire una caratterizzazione dettagliata della proteina I2S ricombinante purificata usando metodi sopra descritti.

SDS-PAGE

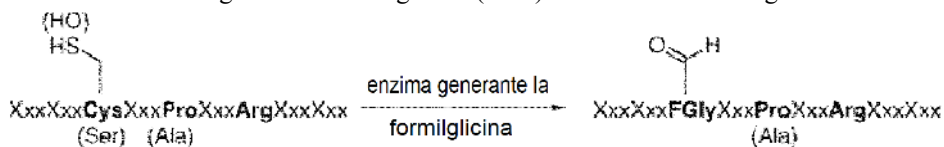
Per l'esperimento, la proteina I2S ricombinante è stata generata usando le linee cellulari umane 2D e 4D in due reazioni di coltura cellulare prive di siero separate. I campioni sono stati raccolti e purificati usando i metodi sopra descritti. L'enzima I2S purificato è stato analizzato mediante SDS-PAGE, e trattato con colorazione all'argento per la visualizzazione. I risultati esemplificativi sono mostrati in figura 8. Come si può osservare dalla figura 8, la proteina I2S ricombinante purificata usando metodi descritti nella presente, presenta pattern di bandeggio paragonabili rispetto al campione di riferimento di I2S purificata usando il metodo standard.

Mappa peptidica

La proteina I2S ricombinante prodotta dalla linea cellulare 2D I2S-AF è stata purificata usando metodi come sopra descritto. I2S ricombinante purificata e un campione di I2S umana di riferimento sono stati ciascuno sottoposti a digestione proteolitica ed esaminati mediante analisi HPLC. Una mappa peptidica esemplificativa rispetto a quella di I2S di riferimento è mostrata in figura 9.

Percentuale di conversione in formilglicina

La mappatura peptidica può essere usata per determinare la percentuale di conversione in FGly. L'attivazione di I2S richiede la conversione della cisteina (corrispondente alla posizione 59 della I2S umana matura) in formilglicina mediante l'enzima generante formilglicina (FGE) come mostrato di seguito:



Pertanto, la percentuale di conversione in formilglicina (%FG) può essere calcolata usando la seguente formula:

$$\% \text{FG (di DS)} = \frac{\text{Numero di molecole di I2S attive}}{\text{Numero di molecole di I2S totali (attive+inattive)}} \times 100$$

Ad esempio FG al 50% indica che metà della I2S ricombinante purificata è enzimaticamente inattiva senza alcun

effetto terapeutico.

La mappatura peptidica è stata usata per calcolare %FG. In breve, una proteina I2S ricombinante purificata è stata digerita in peptidi corti usando una proteasi (ad es., tripsina o chimotripsina). I peptidi corti sono stati separati e caratterizzati usando HPLC. Il peptide contenente la posizione corrispondente alla posizione 59 della I2S umana matura è stato caratterizzato per determinare se la Cys in posizione 59 è stata convertita in una FGly rispetto a un controllo (ad es., una proteina I2S senza conversione in FGly o una proteina I2S con il 100% di conversione in FGly). La quantità di peptidi contenenti FGly (corrispondente al numero di molecole di I2S attiva) e la quantità totale di peptidi con FGly e Cys (corrispondente al numero totale di molecole di I2S) possono essere determinate in base alle corrispondenti aree di picchi ed è stato calcolato il rapporto che indica la %FG. I risultati esemplificativi sono mostrati in tabella 14.

Mappa dei glicani – Contenuto di mannosio-6-fosfato e acido sialico

È stata determinata la composizione di glicani e acido sialico della proteina I2S ricombinante purificata. È stata eseguita la quantificazione della composizione dei glicani, usando cromatografia a scambio anionico per produrre una mappa dei glicani. Come descritto di seguito, la mappa dei glicani della I2S ricombinante purificata in condizioni descritte nella presente è costituita da sette gruppi di picchi, che eluiscono secondo una quantità crescente di cariche negative almeno parzialmente derivate dall'acido sialico e dalle glicoforme di mannosio-6-fosfato derivanti dalla digestione enzimatica. In breve, I2S ricombinante purificata dalla coltura cellulare priva di siero (I2S-AF 2D priva di siero e I2S-AF 4D priva di siero) e I2S ricombinante di riferimento, sono state trattate con (1) enzima neuraminidasi purificato (isolato da *Arthrobacter Ureafaciens* (10 mU/ μ L), Roche Biochemical (Indianapolis, IN), n. Cat. 269 611 (1U/100 μ L)) per la rimozione dei residui acido sialico, (2) fosfatasi alcalina per 2 ore a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per il rilascio completo dei residui mannosio-6-fosfato, (3) fosfatasi alcalina + neuraminidasi, o (4) nessun trattamento. Ciascuna digestione enzimatica è stata analizzata mediante cromatografia a scambio anionico ad alta prestazione con rivelazione amperometrica pulsata (HPAE-PAD) usando una colonna analitica CarboPac PA1 dotata di una pre-colonna Dionex CarboPac PA1. Sono stati fatti correre una serie di standard di acido sialico e mannosio-6-fosfato da 0,4 a 2,0 nmoli per ciascun saggio. Un metodo isocratico usando acetato di

sodio 48 mM in idrossido di sodio 100 mM è stato eseguito per un minimo di 15 minuti a una portata di 1,0 mL/min a temperatura di colonna ambiente per eluire ciascun picco. I dati generati da ciascuna singola corsa, per i campioni sia di I2S-AF sia I2S di riferimento sono stati ciascuno combinati in una singola cromatografia per rappresentare la mappa dei glicani per ciascuna rispettiva proteina ricombinante. Come indicato in Figura 10, la mappa dei glicani per I2S purificata dal terreno privo di siero presentava picchi di eluizione rappresentativi (nell'ordine di eluizione) costituiti da glicani neutri, mono, disialilati, monofosforilati, trisialilati e ibridi (mannosio-6-fosfato monosialilati e di capping), tetrasialilati e ibridi (mannosio-6-fosfato disialilati e di capping) e difosforilati. Le mappe dei glicani esemplificative sono mostrate in Figura 10.

Il contenuto di acido sialico medio (moli di acido sialico per mole di proteina) in ciascun campione di I2S ricombinante è stato calcolato dall'analisi di regressione lineare degli standard di acido sialico. Ciascuna corsa cromatografica è stata visualizzata usando il software PeakNet 6. Gli standard di acido sialico e l'acido sialico rilasciato dai campioni di controllo e di test del saggio I2S ricombinante compaiono come singolo picco. La quantità di acido sialico (nmoli) per I2S è stata calcolata come valore grezzo usando la seguente equazione:

$$S.A.(mole\ per\ mole\ I2S) = \frac{nmoli\ di\ acido\ sialico}{(0,3272)(C)}$$

in cui C è la concentrazione proteica (in mg/ml) del campione o controllo del saggio I2S ricombinante.

Il valore corretto di acido sialico come moli di acido sialico per mole di proteina per ciascun campione di test è stato calcolato usando la seguente formula:

$$S.A.\ corretto = \frac{(Valore\ di\ acido\ sialico\ grezzo\ nel\ campione) \times (valore\ di\ controllo\ del\ saggio\ con\ idursulfasi\ stabilito)}{(valore\ di\ acido\ sialico\ grezzo\ controllo\ di\ saggio\ con\ idursulfasi)}$$

I dati esemplificativi indicativi del contenuto di acido sialico sulla I2S ricombinante purificata dalle linee cellulari I2S-AF 2D o 4D sono mostrati in tabella 14.

Tabella 14: Caratteristiche esemplificative di I2S purificata dalla coltura cellulare priva di siero

Saggio	I2S-AF 2D (privo di siero)
Mappatura peptidica	
L1	101

L10	100
L12	102
L13	97
L14	101
L17	100
L20	102
Proteina della cellula ospite	< 62,5 ng/mg
Area % HPLC a scambio ionico	
Picco A	62
Picco A+B	82
Picco E+F	0
% di Formilglicina	87
Attività specifica (U/mg) (saggio di rilascio di solfato)	64
% HPLC a esclusione sterica	≥ 99,8 (n=13)
Mappatura dei glicani	
Monosialilati	105
Disialilati	93
Monofosforilati	139
Trisialilati	89
Tetrasialilati	125
Difosforilati	95
Acido sialico (mol/mol)	20

Attività specifica

L'attività specifica dell'enzima I2S ricombinante purificato usando i metodi descritti nella presente, è stata analizzata usando il saggio di rilascio di solfato in vitro o il saggio 4-MUF.

Saggio di rilascio di solfato *in vitro*

L'attività di rilascio del solfato *in vitro* è stata condotta usando eparina disaccaride come substrato. In particolare, questo saggio misura la capacità di I2S di rilasciare ioni solfato da un substrato di origine naturale, eparina disaccaride. Il solfato rilasciato può essere quantificato mediante cromatografia ionica dotata di un rivelatore di conduttività. In breve, ai campioni è stato dapprima sostituito il tampone con acetato di Na 10 mM, pH 6 per rimuovere l'inibizione da parte dei ioni fosfato nel tampone di formulazione. I campioni sono stati quindi diluiti a 0,075 mg/ml con tampone di reazione (acetato di Na 10 mM, pH 4.4) e incubati per 2 ore a 37°C con eparina disaccaride a un rapporto enzima/substrato di 0,3 µg di I2S/100 µg di substrato in un volume di reazione di 30 µL. La reazione è stata quindi arrestata riscaldando i campioni a 100°C per 3 min. L'analisi è stata eseguita usando una colonna analitica Dionex IonPac AS18 con una pre-colonna IonPac AG18. È stato usato un metodo isocratico con idrossido di potassio 30 mM a 1,0 mL/min per 15 minuti. La quantità di solfato rilasciata dal campione di I2S è stata calcolata dall'analisi di regressione lineare degli standard di solfato nell'intervallo di 1,7 a 16,0 nmoli. Il valore riportabile è stato espresso come unità per mg di proteina, in cui 1 unità è definita come 1 µmole di solfato rilasciato per ora e la concentrazione proteica è determinata dalle misurazioni A280. I risultati esemplificativi sono mostrati in tabella 14.

Saggio 4-MUF

L'attività specifica dell'enzima I2S ricombinante purificato può anche essere analizzata usando un saggio 4-MUF basato sulla fluorescenza. In breve, il saggio misura l'idrolisi del substrato 4-metilumbelliferil-solfato da parte di I2S (4-MUF-SO₄). Dopo il taglio del substrato 4-MUF-SO₄ da parte di I2S, la molecola è convertita in solfato e 4-metilumbelliferone (4-MUF) naturalmente fluorescente. Come risultato, l'attività dell'enzima I2S può essere determinata valutando la variazione totale del segnale fluorescente nel tempo. Per questo esperimento, l'enzima I2S purificato è stato incubato con una soluzione di 4-metilumbelliferil-solfato (4-MUF-SO₄), sale di potassio, Sigma n. Cat. M-7133). La calibratura del saggio è stata eseguita usando una serie di campioni di riferimento di controllo, usando l'enzima I2S disponibile in commercio diluito/a 1:100, 1:200 e 1:20.000 della soluzione stock. Il saggio enzimatico è stato eseguito a 37°C e valutato usando un fluorometro calibrato. Usando

i valori di fluorescenza ottenuti per ciascuno standard di riferimento, è stato determinato il coefficiente percentuale di variazione usando la seguente equazione:

$$\% CV = \frac{\text{Deviazione standard dei valori di fluorescenza grezza } (N - 3)}{\text{Valore di fluorescenza medio}} \times 100\%$$

I valori CV percentuali sono stati quindi usati per calcolare la fluorescenza media corretta per ciascun campione, al fine di determinare l'attività enzimatica riportabile, espressa in mU/mL usando la seguente formula:

$$mU / mL = (CFU) \left(\frac{1 \text{ nmole} / L}{10 \text{ FU}} \right) \left(\frac{1L}{10^3 \text{ mL}} \right) \left(\frac{2,11 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ ora}}{60 \text{ min}} \right) \left(\frac{1 \text{ mU}}{\text{nmole}} \right) (DF)$$

CFU = fluorescenza media corretta negativa

DF – fattore di diluizione

Una milliunità di attività è la quantità di enzima necessaria a convertire 1 nanomole di 4-metilumbelliferil-solfato in 4-metilumbelliferone in 1 minuto a 37°C.

Profilo di carica

Per questo esperimento, è stata determinata la distribuzione di carica di ciascuna I2S ricombinante purificata mediante cromatografia a scambio anionico forte (SAX), con un sistema di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il metodo separa le varianti di I2S ricombinante nel campione, in base alle differenze di carica di superficie. A pH 8.00, le specie a carica negativa adsorbono sulla carica positiva fissa della colonna SAX. È usato un gradiente di forza ionica crescente per eluire ciascuna specie proteica in proporzione alla forza della loro interazione ionica con la colonna. Cento microgrammi di I2S purificata, isolata dalla linea cellulare 2D in condizioni di crescita prive di siero o l'enzima I2S ricombinante di riferimento sono stati caricati su una colonna Amersham Biosciences Mini Q PE (4,6 x 50 mm) mantenuta a temperatura ambiente ed equilibrata con Tris-HCl 20 mM, pH 8.00. L'eluizione a gradiente è stata realizzata a una portata di 0,80 mL/min, usando una fase mobile di Tris-HCl 20 mM, cloruro di sodio 1.0 M, pH 8.00. La concentrazione proteica è stata determinata continuamente durante la corsa, misurando l'assorbanza della luce dell'eluizione del campione a una lunghezza d'onda di 280 nm. I risultati esemplificativi che mostrano i profili di carica osservati per I2S ricombinante purificata dalle linee cellulari 2D e 4D sono mostrati in Figura 11.

ELENCO SEQUENZE

<110> Shire Human Genetic Therapies
<120> PURIFICAZIONE DI IDURONATO-2-SOLFATASI
<130> 2006685-0342
<150> 61/666,733
<151> 2012-06-29
<160> 5
<170> PatentIn versione 3.5
<210> 1
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<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 Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
225 230 235 240

Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile
245 250 255

Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg
260 265 270

Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg
275 280 285

Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile
290 295 300

Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
305 310 315 320

Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe
325 330 335

Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu
340 345 350

Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro
355 360 365

Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr
370 375 380

Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
385 390 395 400

Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His
405 410 415

Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro
420 425 430

Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro
435 440 445

Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly
450 455 460

Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
465 470 475 480

Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu
485 490 495

Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn
500 505 510

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

<210> 2
<211> 550
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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

RIVENDICAZIONI

1. Una composizione comprendente iduronato-2-solfatasi (I2S) ricombinante purificata avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, in cui la I2S ricombinante purificata comprende una conversione per almeno il 70% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di SEQ ID NO:1 in C α -formilglicina (FGly), e in cui la I2S ricombinante purificata contiene meno di 150 ng/mg di proteina della cellula ospite (HCP).
2. La composizione della rivendicazione 1, in cui la proteina I2S ricombinante purificata:
 - i. contiene almeno il 10% di oligosaccaridi bis-fosforilati per molecola;
 - ii. contiene in media almeno 16 acidi sialici per molecola;
 - iii. è caratterizzata da una mappa dei glicani comprendente sette o meno gruppi di picchi selezionati tra i gruppi di picchi indicativi di proteina I2S neutra (gruppo di picchi 1), mono-sialilata (gruppo di picchi 2), di-sialilata (gruppo di picchi 3), monofosforilata (gruppo di picchi 4), tri-sialilata (gruppo di picchi 5), tetra-sialilata (gruppo di picchi 6), o difosforilata (gruppo di picchi 7);
 - iv. ha attività specifica di almeno 40 U/mg come determinato mediante un saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato; oppure
 - v. ha attività specifica di almeno 20 U/mg come determinato mediante un saggio *in vitro* di conversione di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF.
3. La composizione della rivendicazione 1 o della rivendicazione 2, in cui la proteina I2S ricombinante purificata contiene meno di 100 ng/mg di HCP.
4. La composizione della rivendicazione 1 o della rivendicazione 2, in cui la proteina I2S ricombinante purificata contiene meno di 80 ng/mg di HCP.
5. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui I2S ricombinante purificata contiene almeno il 50% di oligosaccaridi bis-fosforilati per molecola.
6. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica di almeno 50 U/mg come determinato mediante un saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato.

7. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha attività specifica di almeno 60 U/mg come determinato mediante un saggio di attività di rilascio di solfato *in vitro* usando eparina disaccaride come substrato.
8. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica di almeno 30 U/mg come determinato mediante un saggio di conversione *in vitro* di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF.
9. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica di almeno 40 U/mg come determinato mediante un saggio di conversione *in vitro* di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF.
10. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica di almeno 50 U/mg come determinato mediante un saggio di conversione *in vitro* di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF.
11. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la proteina I2S ricombinante purificata ha un'attività specifica di almeno 60 U/mg come determinato mediante un saggio di conversione *in vitro* di 4-MUF-SO₄ in 4-MUF.
12. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la I2S ricombinante purificata comprende una conversione di almeno il 75% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di SEQ ID NO:1 in C α -formilglicina (FGly).
13. La composizione di una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la I2S ricombinante purificata comprende una conversione di almeno l'85% del residuo cisteina corrispondente a Cys59 di SEQ ID NO:1 in C α -formilglicina (FGly).
14. Una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-13, per l'uso nel trattamento della sindrome di Hunter.

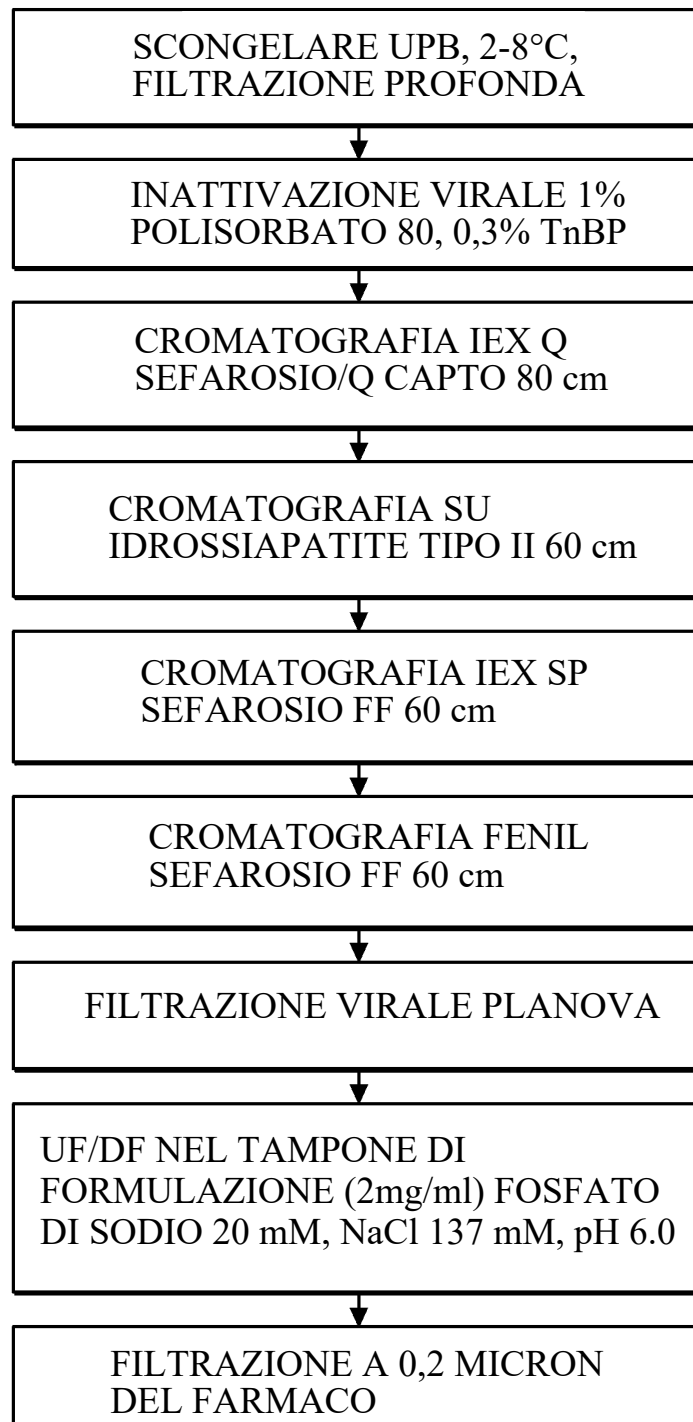
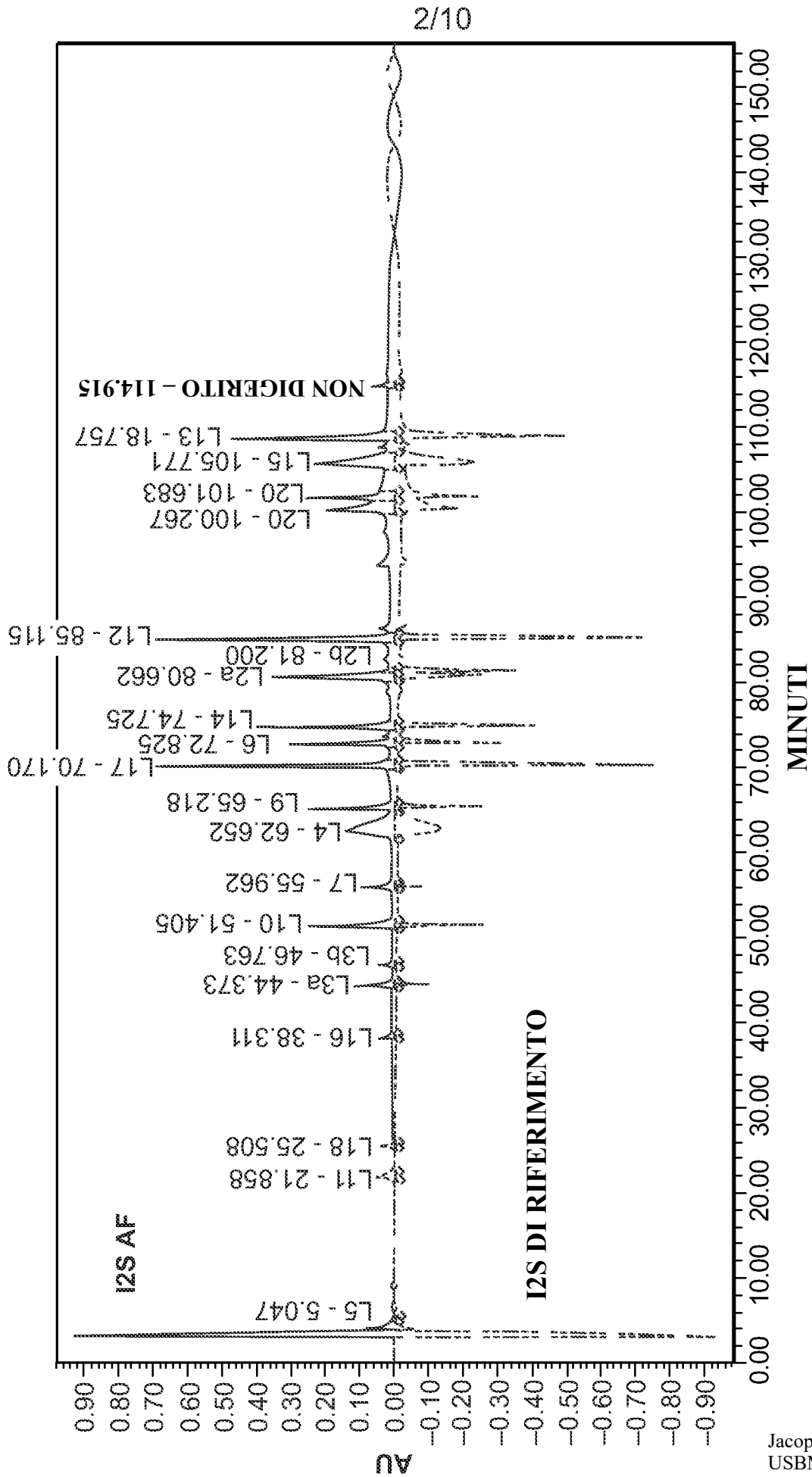


FIG. 1



2/10

FIG. 2

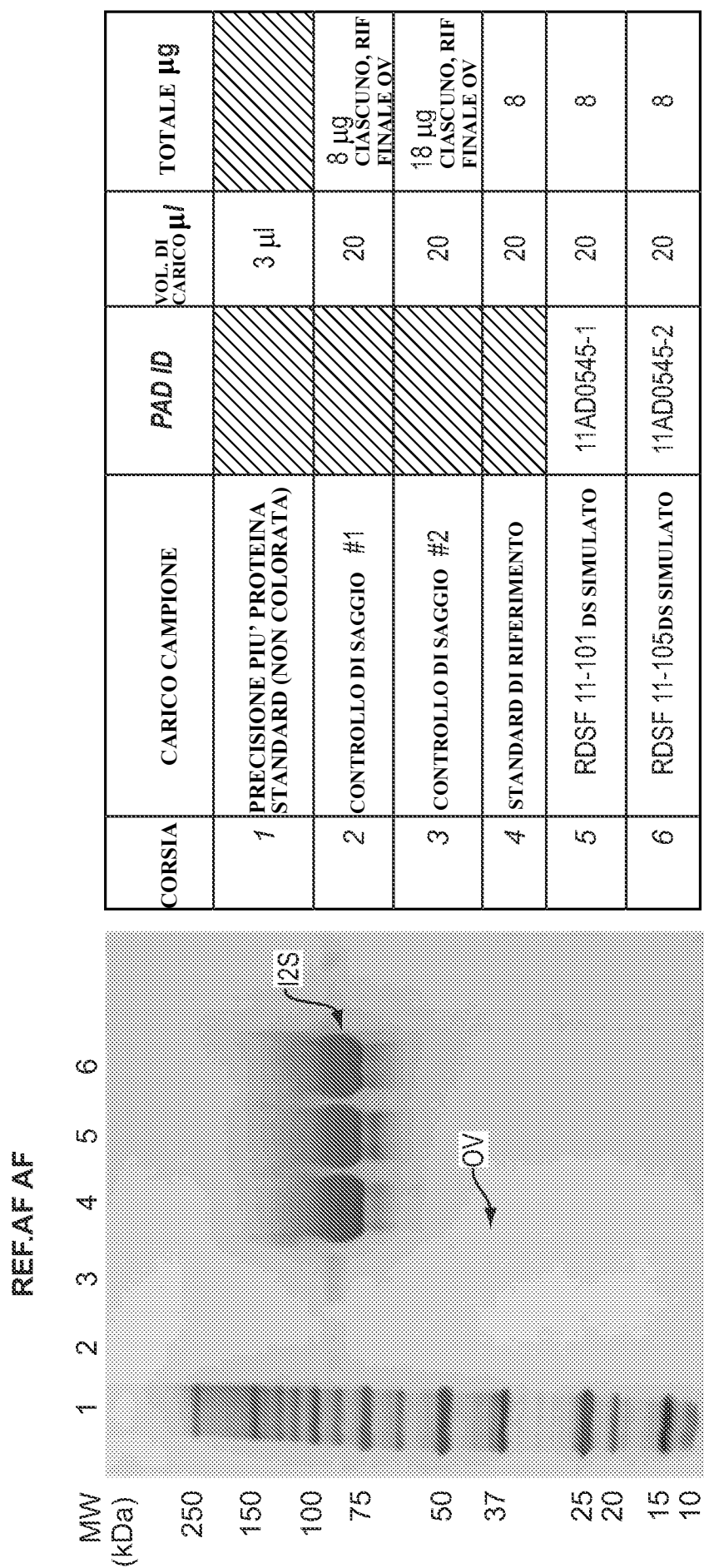


FIG. 3

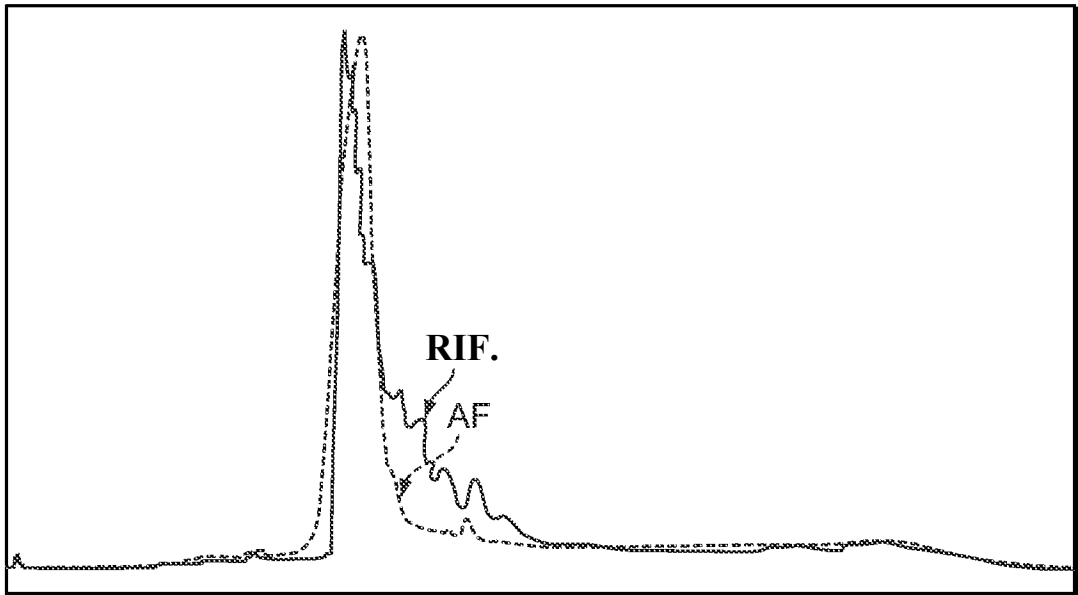


FIG. 4

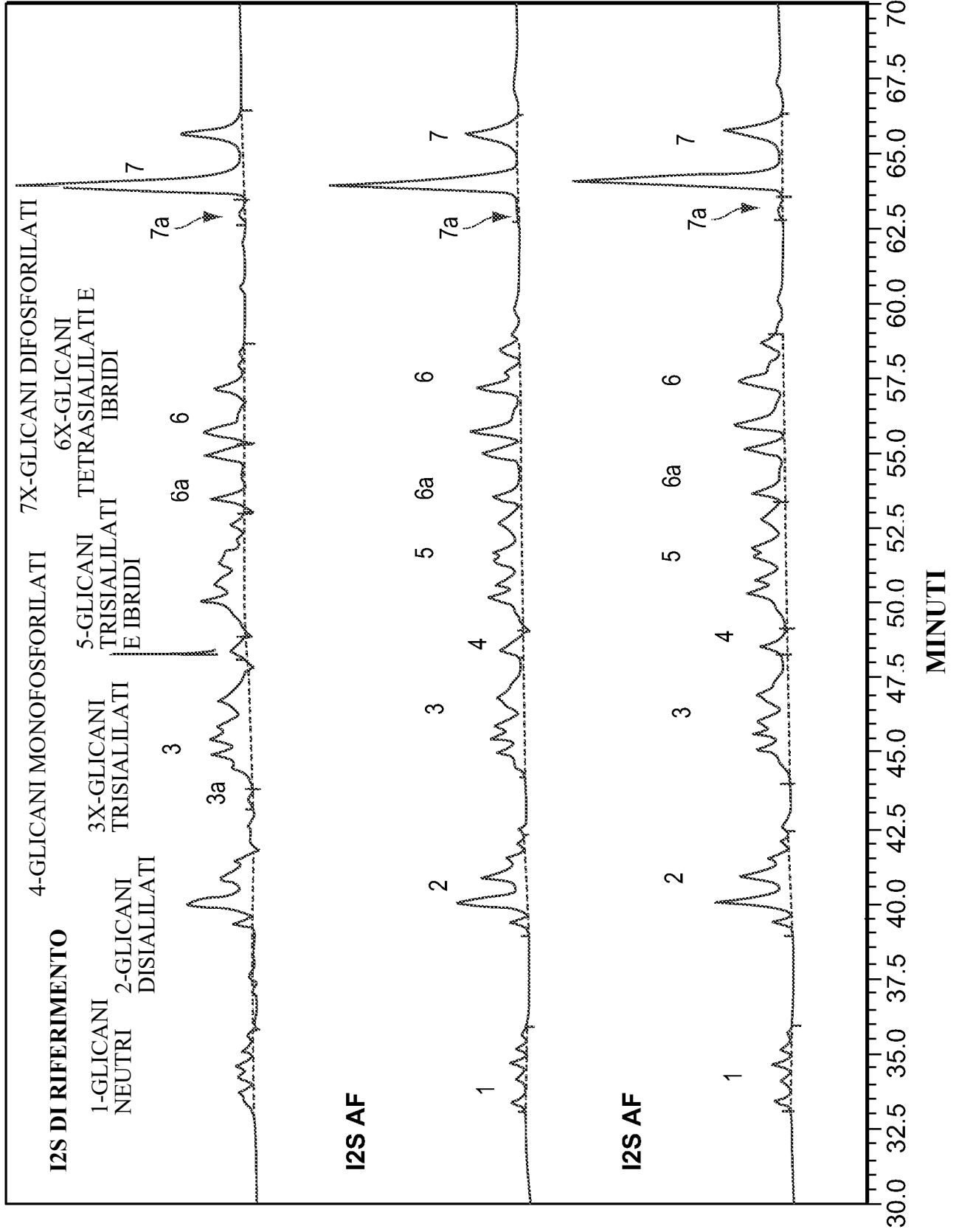


FIG. 5

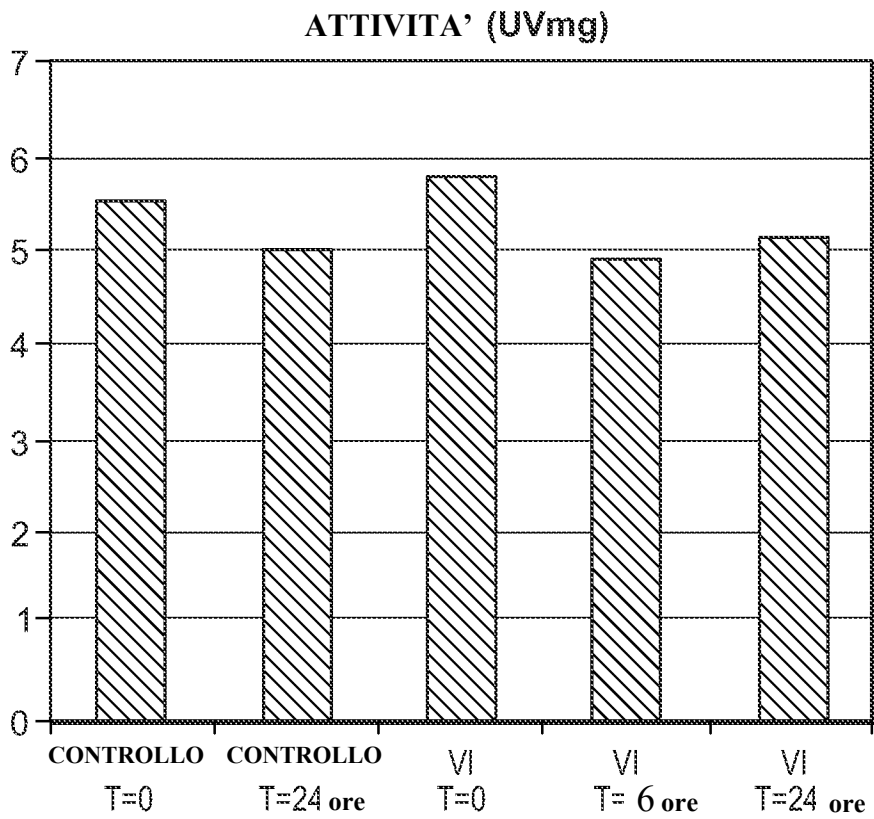


FIG. 6

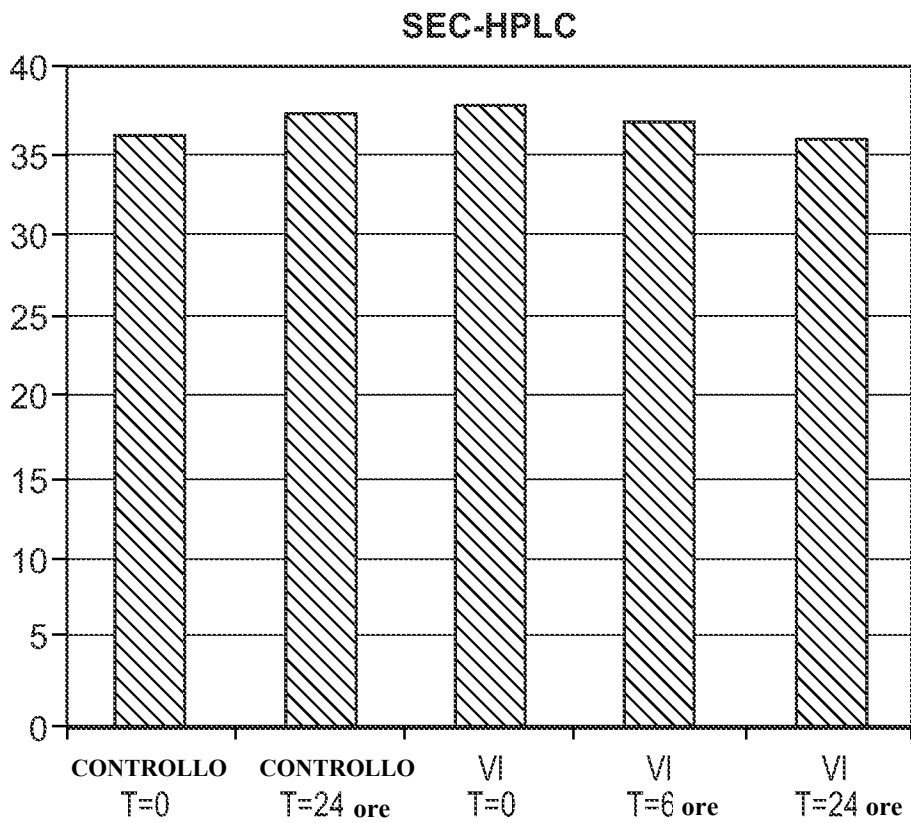
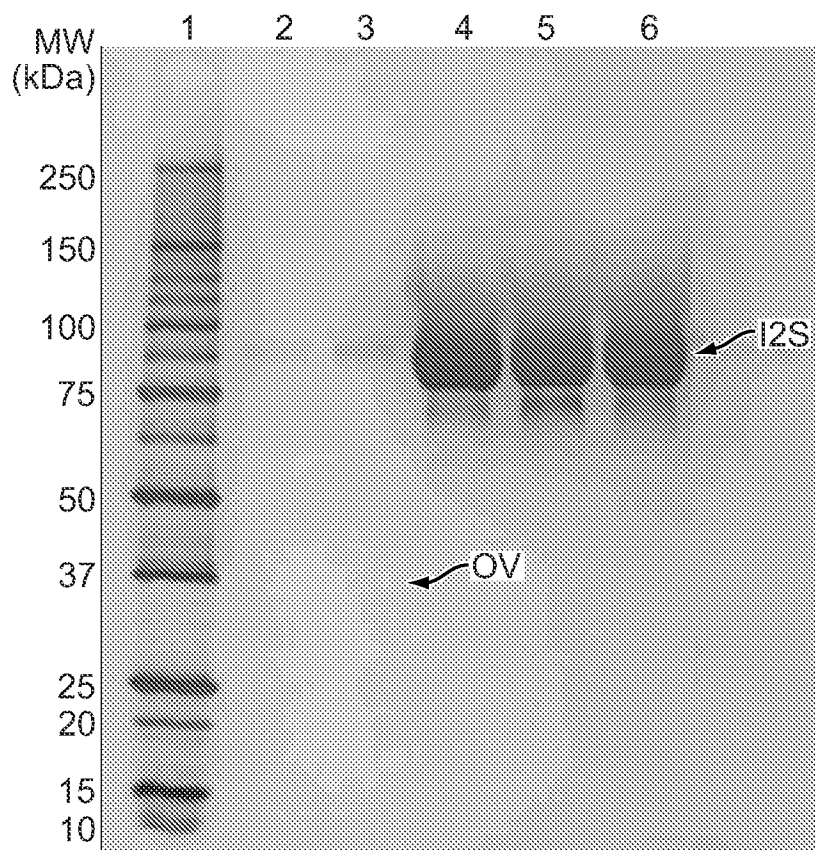
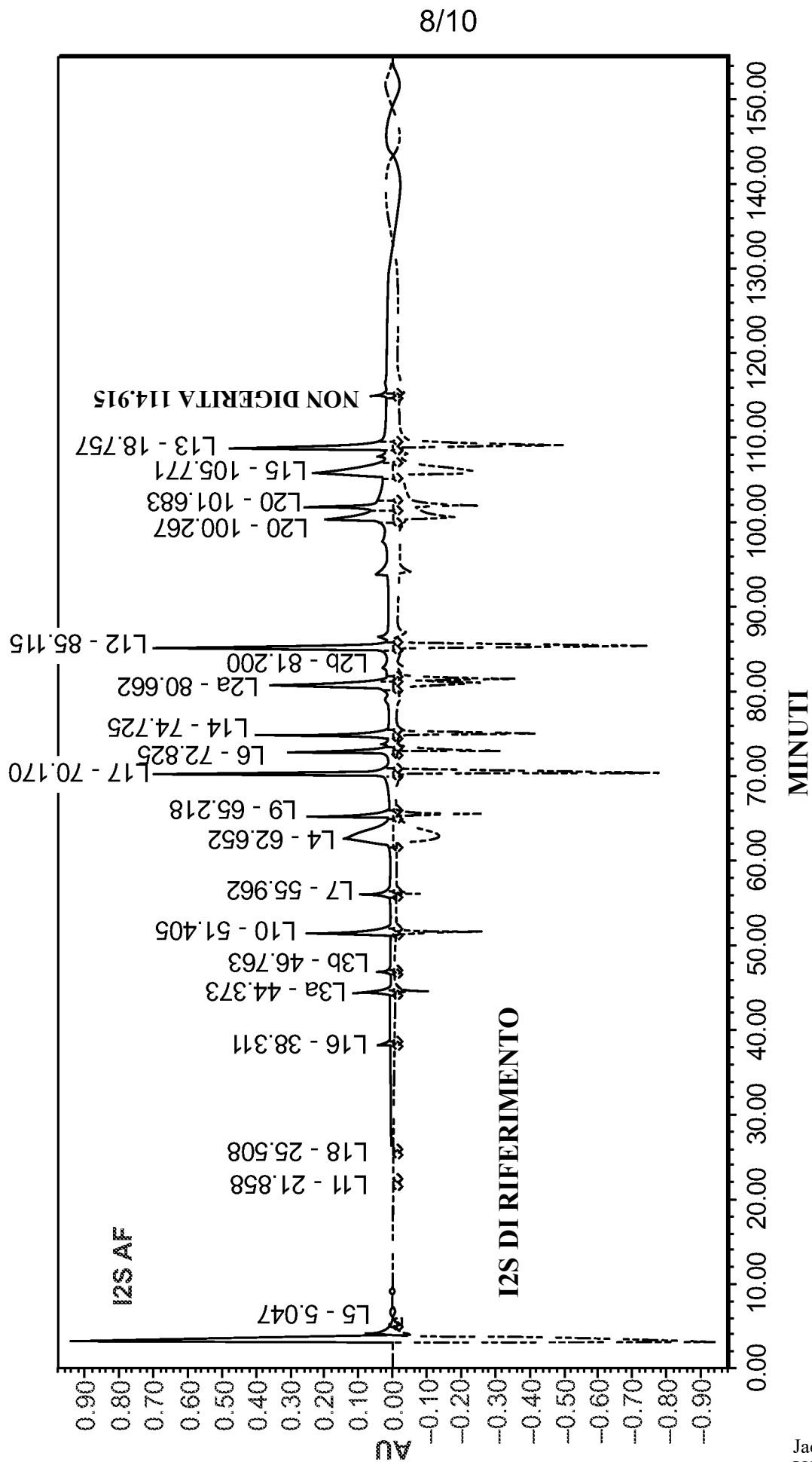


FIG. 7



CORSIA	CAMPIONE DI CARICO	VOLUME DI CARICO	TOTALE μg
1	STANDARD DI PROTEINA	3 μl	
2	CONTROLLO DI SAGGIO #18	20 μl	μg
3	CONTROLLO DI SAGGIO #2	20 μl	16 μg
4	STANDARD DI RIFERIMENTO DI I2S	20 μl	8 μg
5	COLTURA PRIVA DI SIERO I2S-AF 2D	20 μl	8 μg
6	COLTURA PRIVA DI SIERO I2S-AF 4D	20 μl	8 μg

FIG. 8



01/8

FIG. 9

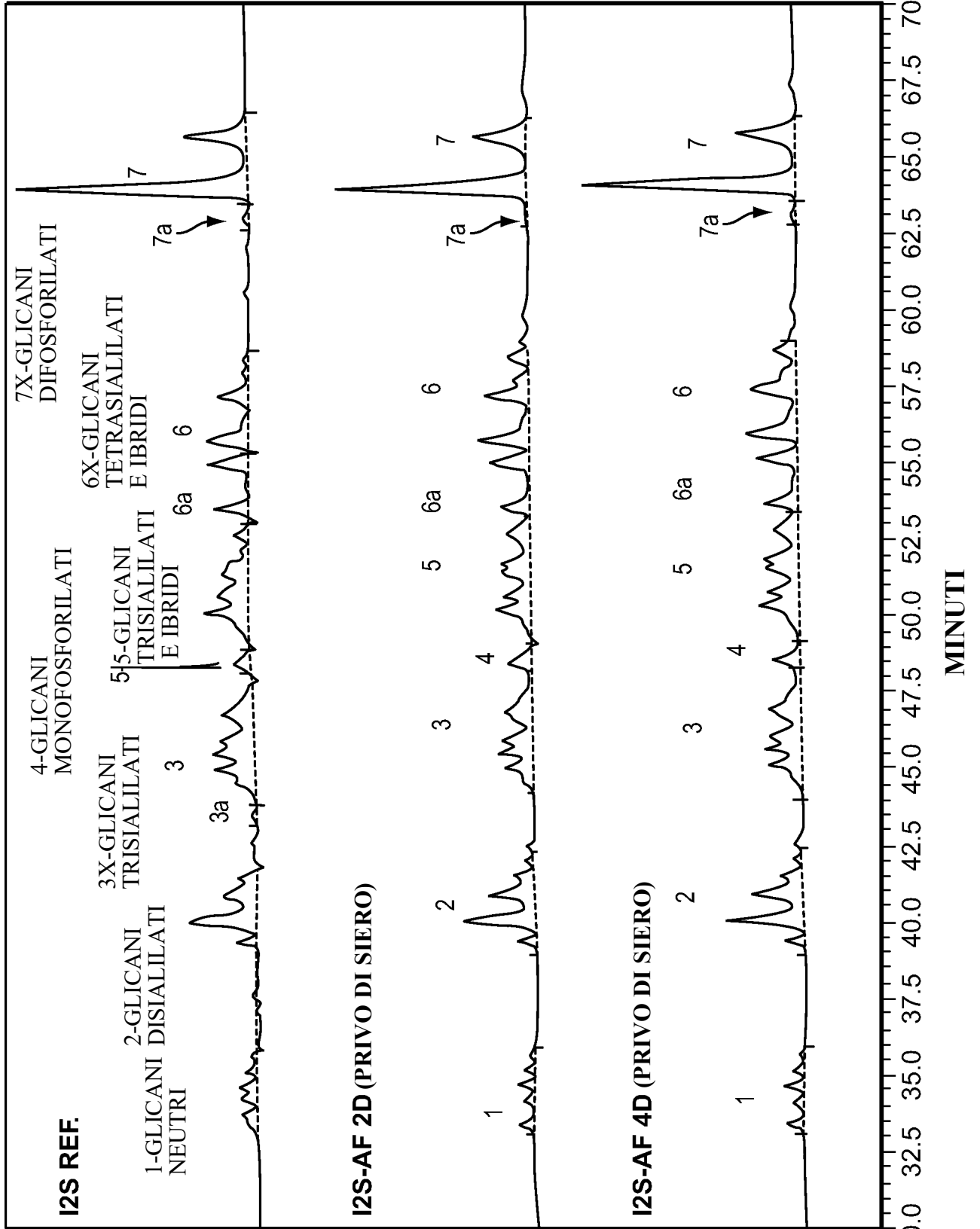


FIG. 10

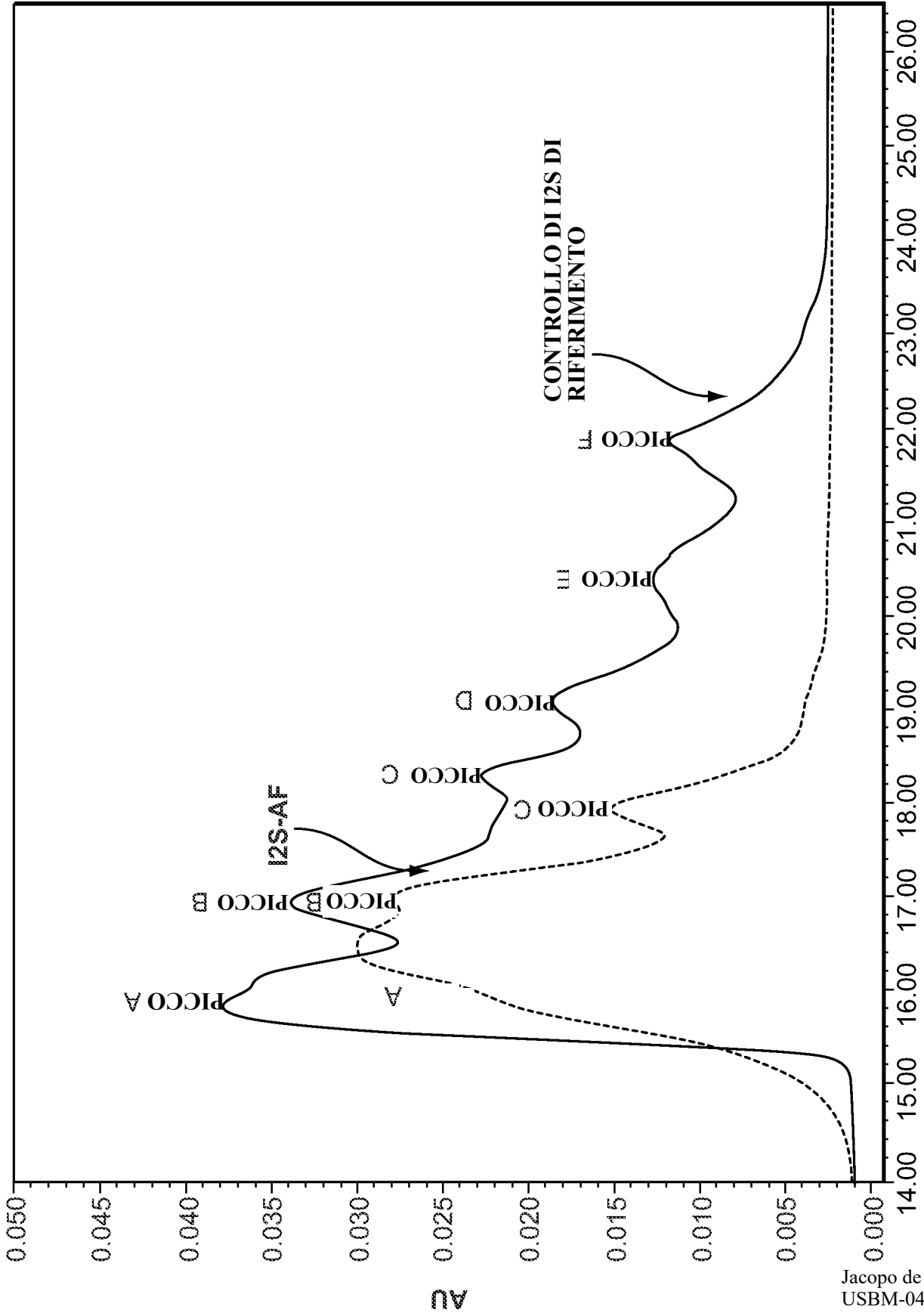


FIG. 11