



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2013107765, 22.07.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2011Дата регистрации:
27.12.2016

Приоритет(ы):

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

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

(45) Опубликовано: 10.01.2017 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.02.2013(86) Заявка РСТ:
US 2011/045011 (22.07.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/012718 (26.01.2012)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КОППАКА Виш (US),
ВЕЛЛАР Мишель Клод (US),
ОКХАМАФЕ Аугустус О. (US),
АРАЙА Кидисти (US)

(73) Патентообладатель(и):

БАЙОМАРИН ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US20100068195 A1, 18.03.2010.
RU2195492 C2, 27.12.2002. BIELICKI J. et al.,
Expression, purification and characterization
of recombinant human
N-acetylgalactosamine-6-sulphatase,
Biochemical Journal Vol. 311(Pt 1), pp. 333-339,
1995.(54) **ПРОИЗВОДСТВО АКТИВНОЙ ВЫСОКОФОСФОРИЛИРОВАННОЙ N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИН-6-СУЛЬФАТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**(57) **Формула изобретения**

1. Способ получения композиции, содержащей очищенный рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу (GALNS) человека, где указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO: 4, и

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

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

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

и где по меньшей мере 98% указанного фермента GALNS представлен в форме предшественника, как это определено путем SDS-CGE, включающий:

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

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

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

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

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

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

ж) корректировку элюата с инактивированными вирусами и pH 3,5 из этапа е) до приблизительно pH 5,0, после чего загрузку указанного элюата с инактивированными вирусами с pH 5,0 в полирующую колонку ToyoPearl Butyl 650 M, промывание колонки в условиях, при которых фермент GALNS удерживается в колонке, и элюирование фермента GALNS из колонки;

з) буфер-обмен элюата из полирующей колонки ToyoPearl Butyl 650 M из этапа ж) в композицию, включающую 20 mM NaOAc/HOAc, 50 mM NaH_2PO_4 , 30 mM аргинин HCl, 2% (в/о) сорбитол, pH 5,4, и корректировку концентрации фермента GALNS в композиции до примерно 3 мг/мл;

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

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

2. Композиция для производства лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего мукополисахаридозом типа IVa (МПС IVa) или синдромом Моркио типа А, полученная в соответствии с п. 1, включающая эффективное количество рекомбинантного фермента N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, где

указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO: 4, и:

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

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

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

мономерную белковую цепь,

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

3. Применение композиции, полученной в соответствии с п. 1, включающей очищенный рекомбинантный фермент N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу (GALNS) человека, в производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего мукополисахаридозом типа IVa (МПС IVa) или синдромом Моркио типа А, где указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO: 4, и:

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

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

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

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

4. Композиция для производства лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего мукополисахаридозом типа IVa (МПС IVa) или синдромом Моркио типа А, включающая:

(а) эффективное количество рекомбинантного фермента N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы (GALNS) человека, очищенного в соответствии с п. 1, где указанный фермент GALNS включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% аминокислотам 27-522 последовательности SEQ ID NO: 4, и

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

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

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

где по меньшей мере 98% указанного фермента GALNS представлено в форме предшественника, как это определено окрашиванием Кумасси синим при проведении анализа SDS-PAGE в восстанавливающих условиях, и

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

(i) NaOAc/HOAc и NaH₂PO₄ в качестве буферных агентов, где концентрация NaOAc/HOAc составляет примерно 20±10 мМ, а концентрация NaH₂PO₄ составляет примерно 50±25 мМ;

(ii) аргинин HCl, Твин-20 и сорбитол в качестве стабилизаторов, где концентрация аргинина HCl составляет примерно 30±20 мМ, концентрация Твин-20 составляет примерно 0.01±0.005% (в/о), а концентрация сорбитола составляет примерно 2.0±1.0% (в/о); и

(iii) где указанная композиция имеет значение рН примерно 5,4±0,4.

5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что чистота фермента GALNS составляет по меньшей мере 95%, как это определено ОФ-ВЭЖХ.

6. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что от 50 до 80% фермента GALNS связывается с рецептором маннозо-6-фосфата в колонке.

7. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что фермент GALNS обнаруживает захват

(К-захват) фибробластами в количестве примерно 1-5 нМ, предпочтительно примерно 1-3,5 нМ.

8. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что концентрация фермента GALNS составляет от примерно 0,5 до 1,5 мг/мл.

9. Применение композиции по любому из пп. 4-8, содержащей очищенный рекомбинантный фермент GALNS человека, в производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего мукополисахаридозом IVa типа (МПС IVa) или синдромом Моркио типа А.

R U 2 6 0 7 3 7 6 C 2

R U 2 6 0 7 3 7 6 C 2