(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월11일
(11) 등록번호 10-1380740
(24) 등록일자 2014년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/46 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0099511
(22) 출원일자 2012년09월07일
심사청구일자 2012년09월07일
(65) 공개번호 10-2014-0002451
(43) 공개일자 2014년01월08일
(30) 우선권주장
61/666,733 2012년06월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR101158673 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
쉐어 휴먼 제네텍 세러피스, 인코포레이티드
미국 매사추세츠 렉싱턴 패트리엇트 웨이 500 (우: 02421)
(72) 발명자
니콜스, 데이브
미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 쉐어 웨이 300
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 김용원

(54) 발명의 명칭 **이듀로네이트-2-설파타제의 정제**

(57) 요 약

본원은 SEQ ID NO:1과 70% 이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열을 가지는 정제된 재조합 이듀로네이트-2-설파타제(I2S)을 포함하는 조성물로서, 상기 정제된 재조합 I2S가 약 70% 이상의 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기의 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 전환율을 포함하며, 상기 정제된 재조합 I2S가 150 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 가지는 정제된 재조합 이듀로네이트-2-설파타제(I2S)를 포함하는 점액다당류증 타입 II(MPS II, 헌터 증후군) 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율(molar ratio conversion)이 70% 이상이며,

추가적으로, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 평균적으로 16개 이상의 시알산(sialic acids)을 함유하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 평균적으로 18개 이상의 시알산을 함유하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 평균적으로 20개 이상의 시알산을 함유하는 조성물.

청구항 4

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 가지는 정제된 재조합 이듀로네이트-2-설파타제(I2S)를 포함하는 점액다당류증 타입 II(MPS II, 헌터 증후군) 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 70% 이상이며,

추가적으로, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 10몰% 이상의 비스-포스포릴레이티드 올리고사카라이드(bis-phorylated olygosaccharide)를 함유하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 50몰% 이상의 비스-포스포릴레이티드 올리고사카라이드를 함유하는 조성물.

청구항 6

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 가지는 정제된 재조합 이듀로네이트-2-설파타제(I2S)를 포함하는 점액다당류증 타입 II(MPS II, 헌터 증후군) 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 70% 이상이며,

추가적으로, 상기 정제된 재조합 I2S가 분자 당, 평균적으로 16개 이상의 시알산(sialic acids)을 함유하며, 분자 당, 10몰% 이상의 비스-포스포릴레이티드 올리고사카라이드를 함유하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S가 추가적으로 중성(피크 그룹 1), 모노-시알릴레이티드(피크 그룹 2), 디-시알릴레이티드(피크 그룹 3), 모노포스포릴레이티드(피크 그룹 4), 트리-시알릴레이티드(피크 그룹 5), 테트라-시알릴레이티드(피크 그룹 6), 및 디포스포릴레이티드(피크 그룹 7) I2S 단백질을 나타내는 피크 그룹으로부터 선택되는 피크 그룹을 7개 이하로 포함하는 글리칸 맵(glycan map)을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 75%인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 80% 이상인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 85% 초과인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 90% 초과인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 95% 초과인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S에서 SEQ ID NO:1의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기로부터 Cα-포르밀글리신 (FGly)으로의 몰비 전환율이 100%인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제된 재조합 I2S가 100 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질(HCP)을 함유하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 제형이 정맥 투여용으로 적합한 제형.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 제형이 수막강내(intrathecal) 투여용으로 적합한 제형.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 제형이 피하(subcutaneous) 투여용으로 적합한 제형.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 제형이 헌터 증후군(Hunter syndrome) 치료용인 제형.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 전후 참조**

[0002] 본 출원은 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 2012년 6월 29일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 61/666,733호를 우선권으로 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 점액다당류증 타입 II(MPS II, 헌터 증후군)는 효소 이듀로네이트-2-설파타제(I2S)의 결함으로부터 발생하는 X-염색체-연관 열성 리소좀 축적병이다. I2S는 글리코사미노글리칸(GAG) 더마탄 설페이트 및 헤파란 설페이트로부터의 말단 2-O-설페이트 모이어티(moiety)를 절단한다. 헌터 증후군을 갖는 환자에서의 I2S 효소 결핍 또는 결함성 I2S 효소로 인해, GAG는 점진적으로 다양한 세포 유형의 리소좀 내에 축적되어, 세포 과다(cellular engorgemen), 장기 종대(organomegaly), 조직 파괴, 및 기관계 기능이상을 야기시킨다.

[0004] 일반적으로, 헌터 증후군을 갖는 사람들에 대한 신체적 소견은 신체 및 신경 증상 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, 헌터 증후군의 일부 경우에, 중추신경계 관련은 발달 지연 및 신경계 문제를 야기시킨다. 헌터 증후군의 비-신경 증상은 보통 출생시에는 존재하지 않지만, 시간이 지남에 따라, 신체의 세포 내의 GAG의 점진적 축적이 신체의 말초 조직에 큰 영향을 미칠 수 있다. 말초 조직 내의 GAG 축적은 환자의 안면 용모에서 독특한 거칢(coarseness)을 야기시키며, 이는 헌터 환자의 규정하는 특징으로서 돌출된 이마, 편평한 콧마루 및 혀 비대의 원인이 된다. 유사하게, GAG의 축적은 신체의 기관계에 해로운 영향을 미칠 수 있다. 처음에 심장, 폐 및 기도 벽의 비후, 및 간, 비장 및 신장의 비정상적 비대로 징후가 나타나며, 이러한 현저한 변화는 궁극적으로 만연된 치명적인 기관 부전을 야기시킬 수 있다. 결과로서, 헌터 증후군은 항상 중증이고, 진행성이며, 생명을 제한한다.

[0005] 효소 대체 요법(ERT)은 헌터 증후군을 갖는 환자에 외인성 대체 I2S 효소를 투여하는 것을 포함하는 헌터 증후군(MPS II)을 치료하기 위한 승인된 요법이다.

발명의 내용

[0006] **발명의 개요**

[0007] 본 발명은 특히, 효소 대체 요법을 위해 재조합적으로 생성된 I2S 단백질을 정제하기 위한 개선된 방법을 제공한다. 본 발명은, 부분적으로, 재조합 I2S 단백질이 4개의 크로마토그래피 컬럼만큼 적은 수의 컬럼을 포함하는 방법을 이용하여 가공되지 않은 생물학적 물질, 예를 들어, I2S-함유 세포 배양 배지로부터 정제될 수 있다는 놀라운 발견에 기초로 한다. 효소 대체 요법을 위한 재조합 I2S의 승인된 현재 정제 방법은 6개의 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 실시예 섹션에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 4개의 컬럼 방법을 이용하여 정제된 재조합 I2S 단백질은 미국 및 다수의 다른 나라에서의 시판 순도 요건에 부합된다. 또한, 본 발명에 따라 정제된 재조합 I2S 효소는 I2S 효소의 활성에 중요한 높은 백분율의 C_{α}-포르밀글리신(FGly)(예를 들어, 70% 초과 및 100% 이하)를 함유하며, 재조합 I2S 단백질의 생체이용률 및/또는 리소좀 표적화를 촉진할 수 있는 글리칸 맵 및 디포스포산 함량과 같은 독특한 특징을 보유한다. 따라서, 본 발명은 재조합 I2S 단백질을 정제하기 위한 효과적이고, 보다 저렴하며, 보다 신속한 방법을 제공한다. 본 발명은 무혈청 배지에서 생성된 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 특히, 유용하다.

[0008] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 음이온-교환크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상을 기초로 한 방법을 이용하여 불순한 제조물로부터 재조합 I2S 단백질을 정제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 6개 미만(예를 들어, 5개 미만, 4개 미만, 또는 3개 미만)의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 2, 3, 4 또는 5개의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 4개의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 100 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질(HCP)(예를 들어, 90 ng/mg 미만의 HCP, 80 ng/mg 미만의 HCP, 70 ng/mg 미만의 HCP, 60 ng/mg 미만의 HCP, 50 ng/mg 미만의 HCP, 40 ng/mg 미만의 HCP, 30 ng/mg 미만의 HCP, 20 ng/mg 미만의 HCP, 10 ng/mg 미만의 HCP)을 함유한다.

[0009] 일부 구현예에서, 적합한 음이온-교환크로마토그래피는 Q 크로마토그래피이다. 일부 구현예에서, 적합한 양이온-교환크로마토그래피는 SP 크로마토그래피이다. 일부 구현예에서, 적합한 혼합 모드 크로마토그래피는 수산화아파타이트(HA) 크로마토그래피이다. 일부 구현예에서, 적합한 소수성 상호작용 크로마토그래피는 페닐 크로마토그래피이다.

[0010] 음이온-교환크로마토그래피(예를 들어, Q 컬럼), 양이온-교환크로마토그래피(예를 들어, SP 컬럼), 혼합 모드 크로마토그래피(예를 들어, HA 컬럼), 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(예를 들어, 페닐 컬럼)가 임의의 순서로 수행될 수 있는 것이 고려된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 음이온-교환크로마토그래피(예를 들어, Q 컬럼), 양이온-교환크로마토그래피(예를 들어, SP 컬럼), 혼합 모드 크로마토그래피(예를 들어, HA 컬럼), 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(예를 들어, 페닐 컬럼)의 순서로 수행된다.

[0011] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액(flow-through)은 음이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, Q 컬럼)으로의 로딩 전에 약 5.0-7.0의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 또는 7.0) 및 약 10-20 mS/cm의 전도율(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 mS/cm)으로 조정된다. 일부 구현예에서, pH는 1M 소듐 아세테이트를 이용하여 조정된다. 일부 구현예에서, 전도율은 5M 염화나트륨을 이용하여 조정된다. 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피 컬럼은 로딩 후 약 5.0-7.0의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 or 7.0)와 함께 약 140 mM 내지 200 mM 범위의 염(예를 들어, NaCl) 농도(예를 들어, 약 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM, 또는 200 mM)를 포함하는 세척 완충액을 이용하여 세척된다. 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피 컬럼은 선형 염(예를 들어, NaCl) 구배를 포함하는 용출 완충액을 이용하여 용출된다. 일부 구현예에서, 적합한 선형 NaCl 구배는 약 0-500 mM 범위의 NaCl(예를 들어, 약 0-400 mM, 약 0-350 mM, 약 0-300 mM, 약 50-500 mM, 약 150-500 mM, 약 150-450 mM, 약 150-400 mM)을 함유한다.

[0012] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 양이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, SP 컬럼)으로의 로딩 전에 약 1 mS/cm 내지 20 mS/cm 범위의 전도율(예를 들어, 약 1 mS/cm 내지 15 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 10 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 8 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 6 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 4 mS/cm, 약 2 mS/cm 내지 4 mS/cm)로 조정된다. 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 양이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, SP 컬럼)으로의 로딩 전에 약 2 mS/cm 내지 4 mS/cm 범위의 전도율(예를 들어, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 mS/cm)로 조정된다. 일부 구현예에서, 전도율은 음이온-교환크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 H_2O로 약 1-2:1(예를 들어, 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, 또는 2:1) 비로 희석시킴으로써 조정된다. 일부 구현예에서, 전도율은 정용여과

(dialfiltration)에 의해 조정된다. 일부 구현예에서, 양이온-교환크로마토그래피 컬럼은 약 5.0-6.5의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0 또는 6.5)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 양이온-교환크로마토그래피 컬럼은 약 0.01 M 내지 약 0.1 M 범위의 포스페이트(예를 들어, NaPO4) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 0.1 M)를 포함하는 완충액으로 수행된다. 일부 구현예에서, 적합한 pH는 약 5.0-6.5(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 또는 6.5)이다.

[0013] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)으로의 로딩 전에 약 0.001 M 내지 약 0.01 M 범위의 포스페이트(예를 들어, NaPO4) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 0.01 M) 및 약 5.0-6.5의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 또는 6.5)로 조정된다. 일부 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 로딩 후 중성 pH 또는 중성에 가까운 pH의 포스페이트(예를 들어, 1-10 mM 소듐 또는 포타슘 포스페이트)을 함유하는 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 로딩된 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 약 10-20 mM 범위의 포스페이트 농도(예를 들어, 약 10-18 mM, 10-16 mM, 10-15 mM, 12-20 mM, 14-18 mM, 14-16 mM)를 갖는 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 로딩된 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM 또는 이를 초과하는 포스페이트 농도를 갖는 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)으로부터의 용출은 구배 포스페이트 완충액으로 달성된다. 일부 구현예에서, 적합한 용출 완충액은 약 1-400 mM(예를 들어, 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) 인산 나트륨 또는 포타슘 포스페이트의 포스페이트 구배를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, HA 컬럼으로부터의 용출은 용출 완충액 내의 포스페이트 농도를 단계적으로 증가시킴으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 단계적 용출 완충액은 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 mM로부터 선택된 포스페이트(예를 들어, 인산 나트륨) 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)으로부터의 용출은 약 50 mM 내지 150 mM 범위의 포스페이트(예를 들어, 인산 나트륨) 농도(예를 들어, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 및 이의 조합의 포스페이트(예를 들어, 인산 나트륨) 농도로부터 선택됨)를 갖는 용출 완충액에 의해 달성된다.

[0014] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 페닐 컬럼)으로의 로딩 전에 약 4.5-6.0의 pH(예를 들어, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.5 M 내지 약 2.0 M 범위의 염(예를 들어, NaCl) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 2.0 M NaCl)로 조정된다. 일부 구현예에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼은 로딩 후 약 4.5-6.0의 pH(예를 들어, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.5 M 내지 2.0 M 범위의 염(예를 들어, NaCl) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 2.0 M NaCl)를 포함하는 세척 완충액을 이용하여 세척된다. 일부 구현예에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼은 약 4.5-6.0의 pH(예를 들어, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.1 M 내지 약 0.5 M 범위의 염(예를 들어, NaCl) 농도(예를 들어, 약 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 또는 0.5 M NaCl)를 포함하는 용출 완충액을 이용하여 용출된다.

[0015] 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼 각각은 14-25 cm 범위의 높이(예를 들어, 15-25 cm, 15-20 cm, 14-24 cm, 14-22 cm, 14-20 cm, 또는 16-18 cm)를 갖는다. 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼 각각은 약 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 cm의 높이를 갖는다.

[0016] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 불순한 제조물을 첫번째 크로마토그래피 컬럼에 로딩하기 전에 바이러스 비활성화 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 비활성화 단계는 불순한 제조물에 세제를 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 마지막 크로마토그래피 컬럼 후에 바이러스 제거 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 초여과 및/또는 정용여과 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 초여과 및/또는 정용여과 단계는 정제된 재조합 I2S 단백질을 약물 제형화 완충액으로 교환하는 것을 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:1과 약 50%(예를 들어, 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:1과 동일한 아미노산 서열을 갖는 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 사용된다.

[0018] 일부 구현예에서, 본 발명은 무혈청 배지 중의 현탁액에서 배양된 포유류 세포에 의해 생성된 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 적합한 무혈청 배지는 동물-유래 성분이 결핍되어 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 적합한 무혈청 배지는 화학적 규명 배지이다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 생물 반응기에서 배양된다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 재조합 I2S 단백질 및 포르밀글리신 생성 효소(FGE)를 공동 발현한다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 인간 세포이다.

[0019] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용되는 불순한 제조물은 포유류 세포로부터 분비된 재조합 I2S 단백질을 함유하는 무혈청 배지로부터 제조된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 불순한 제조물은 동결된 배지 제조물로부터 해동된다.

[0020] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 평균적으로 분자 당 16-22개(예를 들어, 16-21개, 16-20개, 16-19개, 17-22개, 17-21개, 17-20개, 17-19개)의 사양산을 함유한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 평균적으로 분자 당 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 시알산을 함유한다.

[0021] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S(SEQ ID NO:1)의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기의 C_α-포르밀글리신(FGly)으로의 약 70%(예를 들어, 적어도 약 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 이상의 전환율을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S(SEQ ID NO:1)의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기의 C_α-포르밀글리신(FGly)으로의 실질적으로 100%의 전환율을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 기질로서 헤파린 이당류를 이용한 시험관내 설페이트 방출 활성에 의해 결정시 20 U/mg, 30 U/mg, 40 U/mg, 50 U/mg, 60 U/mg, 70 U/mg, 80 U/mg, 90 U/mg, 또는 100 U/mg 이상의 특이적 활성을 갖는다.

[0022] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 시험관내 흡수 검정에 의해 결정시 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%를 초과하는 세포 흡수를 특징으로 한다.

[0023] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 중성(피크 그룹 1), 모노-시알릴레이티드(피크 그룹 2), 디-시알릴레이티드(피크 그룹 3), 모노포스포릴레이티드(피크 그룹 4), 트리-시알릴레이티드(피크 그룹 5), 테트라-시알릴레이티드(피크 그룹 6), 및 디포스포릴레이티드(피크 그룹 7) I2S 단백질 각각을 나타내는 7개의 피크 그룹을 포함하는 글리칸 맵을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 글리칸 맵은 뉴라미니다제 분해 후에 생성된다. 다른 구체예에서, 글리칸 맵은 알칼리성 포스파타제 분해 후에 생성된다.

[0024] 특히, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 정제된 재조합 I2S 단백질, 및 이를 함유하는 약학적 조성물 또는 제형을 제공한다. 일부 구현예에서, 제형은 정맥내, 피하 및/또는 수막강내(intrathecal) 투여용으로 제형화된다. 본 발명은 또한 헌터 증후군의 치료를 필요로 하는 피검체에 정제된 재조합 I2S, 이를 함유하는 약학적 조성물 또는 제형을 투여함으로써 헌터 증후군을 치료하는 방법을 제공한다.

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "I2S 단백질, "I2S", "I2S 효소" 또는 문법적 상당 어구는 달리 특별히 언급되지 않는 한 재조합 I2S 단백질 분자의 제조물을 의미한다.

[0026] 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 상당 어구로 사용된다. 약/대략을 갖거나 갖지 않는 본 출원에서 사용되는 임의의 수는 관련 분야의 당업자에 의해 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포함하는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 장점은 후속되는 상세한 설명에서 명백하다. 그러나, 본 발명의 구체예를 나타내는 상세한 설명은 단지 예시로 제공되며, 이로 제한하는 것이 아니다. 본 발명의 범위 내의 다양한 변화 및 변형은 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

[0028] 정의

[0029] 본 발명이 보다 용이하게 이해되도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 하기에 정의된다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가 정의는 본 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.

[0030] *대략 또는 약*: 하나 이상의 관심 값에 적용되는 본원에서 사용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 참조 값과 유사한 값을 의미한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 문맥에 달리 언급되거나 문맥으로부터 달리

명백하지 않는 한 언급된 참조 값의 어느 한 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 이 미만 내에 해당되는 값의 범위를 의미한다(상기 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외).

[0031] *생물학적 활성*: 본원에서 사용되는 구 "생물학적 활성"은 생물학적 시스템(예를 들어, 세포 배양물, 유기체 등) 내에서 활성을 갖는 임의의 물질의 특징을 의미한다. 예를 들어, 유기체에 투여되는 경우 이러한 유기체에 대한 생물학적 효과를 갖는 물질이 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 생물학적 활성은 시험관내 검정(예를 들어, 시험관내 효소 검정, 예를 들어, 설페이트 방출 검정)에 의해 결정될 수 있다. 특정 구체예에서, 단백질 또는 폴리펩타이드가 생물학적으로 활성인 경우, 단백질 또는 폴리펩타이드의 하나 이상의 생물학적 활성을 공유하는 단백질 또는 폴리펩타이드의 부분은 통상적으로 "생물학적 활성" 부분으로 언급된다. 일부 구현예에서, 피검체에 투여되는 경우 생물학적 활성을 나타내는 단백질은 세포 배양 시스템으로부터 생성되고/되거나 정제된다. 일부 구현예에서, 단백질은 생물학적으로 활성이 되기 위해 추가 처리를 필요로 한다. 일부 구현예에서, 단백질은 생물학적으로 활성이 되기 위해 글리코실화(예를 들어, 시알릴화), 파니실화(farnysylation), 절단, 폴딩, 포르밀글리신 전환율 및 이의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 번역 후 변형을 필요로 한다. 일부 구현예에서, 프로폼(proform)(즉, 미성숙 형태)로 생성되는 단백질은 생물학적으로 활성이 되기 위해 추가 변형을 필요로 할 수 있다.

[0032] *양이온-독립적 만노오스-6-포스페이트 수용체(CI-MPR)*: 본원에서 사용되는 용어 "양이온-독립적 만노오스-6-포스페이트 수용체(CI-MPR)"는 리소좀으로의 수송이 예정된 골지체 내의 산 가수분해효소 전구체 상의 만노오스-6-포스페이트(M6P) 태그에 결합하는 세포 수용체를 의미한다. 만노오스-6-포스페이트에 더하여, CI-MPR은 또한 IGF-II를 포함하는 다른 단백질에 결합한다. CI-MPR은 "M6P/IGF-II 수용체", "CI-MPR/IGF-II 수용체", "IGF-II 수용체" 또는 "IGF2 수용체"로도 알려져 있다. 이러한 용어 및 이의 약어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0033] *크로마토그래피*: 본원에서 사용되는 용어 "크로마토그래피"는 혼합물의 분리를 위한 기술을 의미한다. 통상적으로, 혼합물은 "정지상"으로 언급되는 또 다른 물질을 고정시키는 구조를 통해 운반되는 "이동상"으로 언급되는 유체에 용해된다. 컬럼 크로마토그래피는 정지 베드(stationary bed)가 튜브, 즉, 컬럼 내에 존재하는 분리 기술이다.

[0034] *희석제*: 본원에서 사용되는 용어 "희석제"는 재구성된 제형의 제조에 유용한 약학적으로 허용되는(예를 들어, 인간에게 투여하기에 안전하고 비독성임) 희석 물질을 의미한다. 예시적 희석제는 멸균수, 주사용 정균수(BWFI), pH 완충된 용액(예를 들어, 포스페이트-완충 염수), 멸균 염수, 링거액(Ringer's solution) 또는 덱스트로오스 용액을 포함한다.

[0035] *용출*: 본원에서 사용되는 용어 "용출"은 용매를 이용한 세척에 의해 또 다른 물질로부터 한 물질을 추출하는 방법을 의미한다. 예를 들어, 이온-교환 크로마토그래피에서, 용출은 포획된 이온을 제거하기 위해 로딩된 수지를 세척하는 방법이다.

[0036] *용출액*: 본원에서 사용되는 용어 "용출액"은 이동상 "담체", 및 통상적으로 용출의 결과로서 크로마토그래피로부터 나오는 분석 물질의 조합물을 의미한다.

[0037] *효소 대체 요법(ERT)*: 본원에서 사용되는 용어 "효소 대체 요법(ERT)"은 결실된 효소를 제공함으로써 효소 결핍을 고치는 임의의 치료 방법을 의미한다. 투여 후, 효소는 세포에 의해 흡수되고, 리소좀으로 수송되며, 여기서 상기 효소는 효소 결핍으로 인해 리소좀 내에 축적된 물질을 제거하는 작용을 한다. 통상적으로, 리소좀 효소 대체 요법이 효과적이 되도록 하기 위해서, 치료 효소는 저장 결핍이 나타난 표적 조직 내의 적절한 세포 내의 리소좀으로 전달된다.

[0038] *평형화시키다 또는 평형화*: 크로마토그래피와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "평형화시키다" 또는 "평형화"는 일반적으로 액체(예를 들어, 완충액) 성분의 안정적이고 균등한 분포를 달성하기 위해 첫번째 용액(예를 들어, 완충액)을 또 다른 용액과 함께 균형 상태가 되도록 하는 방법을 의미한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 컬럼을 통해 요망되는 액체(예를 들어, 완충액)의 하나 이상의 컬럼 부피를 통과시킴으로써 평형화될 수 있다.

[0039] *개선시키다, 증가시키다, 또는 감소시키다*: 본원에서 사용되는 용어 "개선시키다", "증가시키다" 또는 "감소시키다" 또는 이의 문법적 상당 어구는 본원에 기재된 치료의 개시 전에 동일 개체에서의 측정과 같은 기준선 측정, 또는 본원에 기재된 치료의 부재 하에서의 대조군 개체(또는 다수의 대조군 개체들)에서의 측정에 비한 값

을 나타낸다. "대조군 개체"는 치료되는 개체와 대략 동일 연령이며, 치료되는 개체와 동일한 형태의 리소좀 축적병에 걸린 개체이다(치료된 개체 및 대조군 개체(들)에서의 질병의 단계가 비교되는 것을 보장함).

[0040] *불순물*: 본원에서 사용되는 용어 "불순물"은 표적 물질 또는 화합물의 화학적 조성물과 상이한, 제한된 양의 액체, 가스, 또는 고체 내의 물질을 의미한다. 불순물은 오염 물질로도 언급된다.

[0041] *링커*: 본원에서 사용되는 용어 "링커"는 융합 단백질에서 자연 단백질 내의 특정 위치에서 나타나는 아미노산 서열이 아닌 아미노산 서열을 의미하며, 이는 일반적으로 가요성이 있거나, 2개의 단백질 모이어티 사이의 a-헬릭스와 같은 구조를 삽입하도록 디자인된다. 링커는 스페이서로도 언급된다.

[0042] *로드(load)*: 본원에서 사용되는 용어 "로드"는 크로마토그래피에서 샘플-함유 액체 또는 고체를 컬럼에 첨가하는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 컬럼에 로딩된 샘플의 특정 성분은 이후에 로딩된 샘플이 컬럼을 통해 통과함에 따라 포획된다. 일부 구현예에서, 컬럼에 로딩된 샘플의 특정 성분은, 로딩된 샘플이 컬럼을 통해 통과함에 따라 컬럼에 의해 포획되지 않거나, "컬럼을 통과"한다.

[0043] *폴리펩타이드*: 본원에서 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 일반적으로 말하면 펩타이드 결합에 의해 서로 부착된 2개 이상의 아미노산의 스트링(string)이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 3-5개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 하나 이상의 펩타이드 결합에 의해 다른 아미노산에 부착된다. 당업자는 폴리펩타이드가 때때로 "비-자연적" 아미노산 또는 폴리펩타이드 사슬로 통합될 수 없는 다른 존재물(entity)을 선택적으로 포함하는 것을 인지할 것이다.

[0044] *푸울(pool)*: 크로마토그래피와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "푸울"은 컬럼을 통해 함께 통과하는 유체의 하나 이상의 분획을 조합시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 크로마토그래피에 의해 분리된 샘플의 요망되는 성분을 함유하는 하나 이상의 분획(예를 들어, "피크 분획")은 단일한 "풀링된(pooled)" 분획을 생성시키기 위해 함께 "풀링"될 수 있다.

[0045] *대체 효소*: 본원에서 사용되는 용어 "대체 효소"는 치료되는 질병에서 결함이 있거나 결핍된 효소의 적어도 일부를 대체시키는 작용을 할 수 있는 임의의 효소를 의미한다. 일부 구현예에서, 용어 "대체 효소"는 치료되는 리소좀 축적병에서 결함이 있거나 결핍된 리소좀 효소의 적어도 일부를 대체시키는 작용을 할 수 있는 임의의 효소를 의미한다. 일부 구현예에서, 대체 효소는 포유류 리소좀에서 축적된 물질을 감소시킬 수 있거나, 하나 이상의 리소좀 축적병 증상을 구제하거나 개선시킬 수 있다. 본 발명에 적합한 대체 효소는 야생형 또는 변형된 리소좀 효소 둘 모두를 포함하며, 재조합 및 합성 방법을 이용하여 생성될 수 있거나, 자연원으로부터 정제될 수 있다. 대체 효소는 재조합 효소, 합성 효소, 유전자-활성화 효소 또는 자연 효소일 수 있다.

[0046] *가용성*: 본원에서 사용되는 용어 "가용성"은 균일한 용액을 형성하는 치료제의 성능을 의미한다. 일부 구현예에서, 투여되고, 작용 표적 부위로 전달되는 용액 내의 치료제의 용해도는 치료적 유효량의 치료제를 작용 표적 부위로 전달하기에 충분하다. 여러 요인이 치료제의 용해도에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 단백질 용해도에 영향을 미칠 수 있는 관련 요인은 이온 강도, 아미노산 서열 및 다른 공동-용해보조제 또는 염(예를 들어, 칼슘염)의 존재를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 치료제는 이의 해당 약학적 조성물 내에서 가용성이다.

[0047] *안정성*: 본원에서 사용되는 용어 "안정적"은 연장된 기간에 걸쳐 치료 효능(예를 들어, 소기의 생물학적 활성 및/또는 생리화학적 온전성의 모두 또는 대부분)을 유지하는 치료제(예를 들어, 재조합 효소)의 성능을 의미한다. 치료제의 안정성, 및 이러한 치료제의 안정성을 유지하는 약학적 조성물의 성능은 연장된 기간(예를 들어, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36개월 이상 동안)에 걸쳐 평가될 수 있다. 제형의 측면에서, 안정적 제형은 제형 내의 치료제가 저장후 및 처리(예를 들어, 동결/해동, 기계적 혼합 및 동결 건조) 동안 이의 물리적 및/또는 화학적 온전성 및 생물학적 활성을 본질적으로 보유하는 제형이다. 단백질 안정성에 대해, 이는 고분자량(HMW) 응집물의 형성, 효소 활성의 상실, 펩타이드 단편의 생성 및 전하 프로파일의 변화에 의해 측정될 수 있다.

[0048] *바이러스 처리*: 본원에서 사용되는 용어 "바이러스 처리"는 바이러스가 단순히 샘플로부터 제거되는 "바이러스 제거", 또는 바이러스가 비-감염성 형태로 샘플에서 유지되는 "바이러스 비활성화"를 의미한다. 일부 구현예에서, 바이러스 제거는 특히, 나노여과 및/또는 크로마토그래피 기술을 이용할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 비활성화는 특히, 용매 비활성화, 세제 비활성화, 저온살균, 산성 pH 비활성화, 및/또는 자외선 비활성화를 이용할 수 있다.

[0049] **발명의 상세한 설명**

[0050] 본 발명은 특히, 6개 미만의 크로마토그래피 단계를 포함하는 방법을 기초로 하는 효소 대체 요법을 위한 재조합 I2S 단백질을 정제하기 위한 개선된 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 음이온-교환크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상을 기초로 한 방법을 이용하여 불순한 제조물로부터 재조합 I2S 단백질을 정제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 Q 크로마토그래피, 수산화아파타이트 (HA) 크로마토그래피, SP 크로마토그래피, 및 페닐 크로마토그래피를 수행함으로써 불순한 제조물로부터 재조합 I2S 단백질을 정제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 정제된 재조합 I2S 단백질 및 이의 사용 방법을 추가로 제공한다.

[0051] 본 발명의 다양한 양태는 하기 서브섹션에서 추가로 상세히 기재된다. 서브섹션의 사용은 본 발명을 제한하는 것을 의미하지 않는다. 각각의 서브섹션은 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있다. 이러한 적용에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0052] *재조합 I2S 단백질*

[0053] 본원에서 사용되는 I2S 단백질은 자연 발생 이듀로네이트-2-설파타제(I2S) 단백질의 적어도 부분적 활성을 대체할 수 있거나, I2S-결함과 관련된 하나 이상의 표현형 또는 증상을 구제할 수 있는 임의의 단백질 또는 단백질의 부분이다. 본원에서 사용되는 용어 "I2S 효소" 및 "I2S 단백질" 및 문법적 상당 어구는 상호교환적으로 사용된다.

[0054] 통상적으로, 인간 I2S 단백질은 전구체 형태로 사용된다. 인간 I2S의 전구체 형태는 신호 펩타이드(전장(full length) 전구체의 아미노산 잔기 1-25), 프로-펩타이드(전장 전구체의 아미노산 잔기 26-33), 및 42 kDa 사슬(전장 전구체의 잔기 34-455) 및 14 kDa 사슬(전장 전구체의 잔기 446-550)로 추가적 처리될 수 있는 사슬(전장 전구체의 잔기 34-550)을 함유한다. 통상적으로, 전구체 형태는 또한 550개의 아미노산을 함유하는 전장 전구체 또는 전장 I2S 단백질로 언급된다. 제거되는 신호 펩타이드를 갖는 성숙 형태의 아미노산 서열(SEQ ID NO:1) 및 통상적인 야생형 또는 자연 발생 인간 I2S 단백질의 전장 전구체(SEQ ID NO:2)가 표 1에 제시된다. 신호 펩타이드에는 밑줄이 있다. 또한, 인간 I2S 단백질 이소형 a 및 b 전구체의 아미노산 서열이 또한 표 1의 SEQ ID NO:3 및 4에 각각 제공된다.

[0055] 표 1. 인간 이듀로네이트-2-설파타제

성숙 형태	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAF AQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTM SVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLC PVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKE FQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPV DFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHG EWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQ SMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEE DPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVW VGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:1)
전장 전구체 (이소형 a)	<u>MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALG</u>SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFN SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL DDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLP EAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPV PSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNS DKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDPL QDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:2)
이소형 b 전구체	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFN SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQEDQSSTGFRLKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
이소형 c 전구체	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLGC YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFN SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYH PSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN PWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL DDLQLANSTIIAFTSDHGFLMRTNT(SEQ ID No:4)

[0056]

[0057] 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 성숙 인간 I2S 단백질(SEQ ID NO:1)이다. 본원에 개시된 바와 같이, SEQ ID NO:1은 인간 I2S 단백질에 대한 정준(canonical) 아미노산 서열이다. 일부 구현예에서, I2S 단백질은 I2S 유전자의 5' UTR 내의 대안적 시작 부위에서의 전사로부터 발생하는 SEQ ID NO:1의 스플라이스 이소형 및/또는 변이체일 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 성숙 인간 I2S 단백질의 상동체(homologue) 또는 유사체(analogue)일 수 있다. 예를 들어, 성숙 인간 I2S 단백질의 유사체는 실질적 I2S 단백질 활성을 보유하면서 야생형 또는 자연 발생 I2S 단백질(예를 들어, SEQ ID NO:1)에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유하는 변형된 성숙 인간 I2S 단백질일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 성숙 인간 I2S 단백질(SEQ ID NO:1)과 실질적으로 상동성이다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:1과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 성숙 인간 I2S 단백질(SEQ ID NO:1)과 실질적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:1과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상으로 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 성숙 인간 I2S 단백질의 단편 또는 일부를 함유한다.

[0058] 또한, 재조합 I2S 단백질은 전장 I2S 단백질이다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 전장 인간 I2S 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 전장 인간 I2S 단백질의 상동체 또는 유사체는 실질적 I2S 단백질 활성을 보유하면서 야생형 또는 자연 발생 전장 I2S 단백질(예를 들어, SEQ ID NO:2)에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유하는 변형된 전장 인간 I2S 단백질일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 전장 인간 I2S 단백질(SEQ ID NO:2)과 실질적으로 상동성이다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:2와 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:2와 실질적으로 동일하다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:2와 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상으로 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 전장 인간 I2S 단백질의 단편 또는 일부를 함유한다. 본원에서 사용되는 전장 I2S 단백질은 통상적으로 신호 펩타이드 서열을 함유한다.

[0059] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 a 단백질이다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 a 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 인간 I2S 이소형 a 단백질의 상동체 또는 유사체는 실질적 I2S 단백질 활성을 보유하면서 야생형 또는 자연 발생 인간 I2S 이소형 a 단백질(예를 들어, SEQ ID NO:3)에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유하는 변형된 인간 I2S 이소형 a 단백질일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 a 단백질(SEQ ID NO:3)과 실질적으로 상동성이다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:3과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:3과 실질적으로 동일하다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:3과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상으로 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 a 단백질의 단편 또는 부분을 함유한다. 본원에서 사용되는 인간 I2S 이소형 a 단백질은 통상적으로 신호 펩타이드 서열을 함유한다.

[0060] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 b 단백질이다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 b 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 인간 I2S 이소형 b 단백질의 상동체 또는 유사체는 실질적 I2S 단백질 활성을 보유하면서 야생형 또는 자연 발생 인간 I2S 이소형 b 단백질(예를 들어, SEQ ID NO:4)에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유하는 변형된 인간 I2S 이소형 b 단백질일 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 b 단백질(SEQ ID NO:4)과 실질적으로 상동성이다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:4와 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:4와 실질적으로 동일하다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 SEQ ID NO:4와 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상으로 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 인간 I2S 이소형 b 단백질의 단편 또는 부분을 함유한다. 본원에서 사용되는 인간 I2S 이소형 b 단백질은 통상적으로 신호 펩타이드 서열을 함유한다.

[0061] 인간 I2S 단백질의 상동체 또는 유사체는 당업자에게 공지된 폴리펩타이드 서열을 변경시키는 방법, 예를 들어, 이러한 방법을 편집한 참고문헌에서 발견되는 방법에 따라 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산의 보존적인 치환은 (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D의 그룹 내에서의 아미노산 중에서 이루어진 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, "보존적인 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어진 단백질의 상대 전하 또는 크기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 의미한다.

[0062] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 세포 흡수 및/또는 리소좀 표적화를 촉진하기 위해 표적 세포의 표면 상의 수용체에 결합하는 모이어티를 함유할 수 있다. 예를 들어, 이러한 수용체는 만노오스-6-포스페이트(M6P) 잔기에 결합하는 양이온-독립적 만노오스-6-포스페이트 수용체(CI-MPR)일 수 있다. 또한, CI-MPR은 또한 IGF-II를 포함하는 다른 단백질에 결합한다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 단백질의 표면 상에 M6P 잔기를 함유한다. 특히, 재조합 I2S 단백질은 CI-MPR에 대해 보다 높은 결합 친화성을 갖는 비스-포스포릴레이티드된 올리고사카라이드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 효소는 효소 당 약 20% 이상 평균에 달하는 비스-포스포릴레이티드된 올리고사카라이드를 함유한다. 다른 구체예에서, 적합한 효소는 효소 당 약 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%의 비스-포스포릴레이티드된 올리고사카라이드를 함유할 수 있다.

[0063] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 효소는 표적 세포의 표면 상의 수용체에 결합할 수 있는 리소좀 표적화 모이어티에 융합될 수 있다. 적합한 리소좀 표적화 모이어티는 IGF-I, IGF-II, RAP, p97, 및 이의 변이체, 상동체 또는 단편(예를 들어, 야생형 성숙 인간 IGF-I, IGF-II, RAP, p97 펩타이드 서열과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상으로 동일한 서열을 갖는 펩타이드를 포함함)일 수 있다. 리소좀 표적화 모이어티는 N-말단, C-말단 또는 내부에서 I2S 단백질 또는 효소에 컨쥬게이션되거나 융합될 수 있다.

[0064] *재조합 I2S 단백질의 생성*

[0065] 본 발명은 다양한 수단에 의해 생성된 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, I2S 단백질은 I2S-엔코딩 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포 시스템을 이용함으로써 재조합적으로 생성될 수 있다. 또한, I2S 단백질은 내인성 I2S 유전자를 활성화시킴으로써 생성될 수 있다.

[0066] 본 발명은 다양한 발현 시스템을 이용하여 생성된 재조합 I2S 단백질을 정제하는데 사용될 수 있는 것이 고려된다. 적합한 발현 시스템은, 예를 들어, 란(egg), 배큘로바이러스,(baculovirus) 식물, 효모, 또는 포유류 세포를 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, I2S 효소는 포유류 세포에서 생성된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 포유류 세포의 비제한적인 예는 BALB/c 마우스 골수종 세포주(NSO/l, ECACC No:85110503); 인간 망막모세포종(PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands); SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); 인간 섬유육종 세포주(예를 들어, HT1080); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK21, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포 +/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린(African green) 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁경부 암종 세포(HeLa, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)를 포함한다.

[0068] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 인간 세포(예를 들어, HT1080)로부터 생성된 재조합 I2S 효소를 정제하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 CHO 세포로부터 생성된 재조합 I2S 효소를 정제하는데 사용된다.

[0069] 통상적으로, 재조합 I2S를 발현하도록 조작된 세포는 본원에 기재된 재조합 I2S 단백질을 엔코딩하는 트랜스진을 포함할 수 있다. 핵산 엔코딩 재조합 I2S는 조절 서열, 유전자 조절 서열, 프로모터, 비코딩 서열 및/또는 재조합 I2S를 발현시키기 위한 다른 적절한 서열을 함유할 수 있는 것이 인지되어야 한다. 통상적으로, 코딩 영역은 상기 핵산 성분 중 하나 이상과 실시가능하게 연결된다.

[0070] "조절 서열"은 통상적으로 코딩서열의 업스트림(5' 비코딩 서열), 코딩서열 내, 또는 코딩서열의 다운스트림(3' 비코딩 서열)에 위치된 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 이는 관련된 코딩서열의 전사, RNA 처리 또는 안정성,

또는 번역에 영향을 미친다. 조절 서열은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 및 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 인지 서열을 포함할 수 있다. 때때로, "조절 서열"은 "유전자 조절 서열"로도 언급된다.

[0071] "프로모터"는 통상적으로 코딩서열 또는 기능성 RNA의 발현을 조절할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 일반적으로, 코딩서열은 프로모터 서열에 대해 3'에 위치된다. 프로모터 서열은 근위 및 보다 원위의 업스트림 성분으로 구성되며, 보다 원위의 업스트림 성분은 종종 인헨서(enhancer)로 언급된다. 따라서, "인헨서"는 프로모터 활성을 자극할 수 있는 뉴클레오타이드 서열이며, 이는 프로모터의 선천적 성분 또는 프로모터의 수준 또는 조직-특이성을 향상시키기 위해 삽입된 이종유래 성분일 수 있다. 프로모터는 자연 유전자로부터 이의 완전체(entirety)로 유래될 수 있거나, 자연에서 발견되는 다양한 프로모터로부터 유래된 다양한 성분으로 구성되거나, 심지어 합성 뉴클레오타이드 세그먼트를 포함할 수 있다. 다양한 프로모터는 다양한 조직 또는 세포 유형에서, 또는 다양한 발달 단계에서, 또는 다양한 환경적 조건에 반응하여 유전자의 발현을 유도할 수 있다.

[0072] "3' 비코딩 서열"은 통상적으로 코딩서열의 다운스트림에 위치된 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 이는 폴리아데닐레이션 인지 서열 및 mRNA 처리 또는 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 조절 신호를 엔코딩하는 다른 서열을 포함한다. 폴리아데닐레이션 신호는 보통 mRNA 전구체의 3' 말단에 폴리아데닐산 트랙(tract)의 첨가에 영향을 미침으로써 특성규명된다.

[0073] "번역 리더 서열" 또는 "5' 비코딩 서열"은 통상적으로 유전자의 프로모터 서열과 코딩서열 사이에 위치된 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 번역 리더 서열은 번역 시작 서열의 완전히 처리된 mRNA 업스트림에 존재한다. 번역 리더 서열은 mRNA로의 일차 전사체(transcript)의 처리, mRNA 안정성 또는 번역 효율에 영향을 미칠 수 있다.

[0074] 통상적으로, 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "실시가능하게 연결된"은 하나의 핵산 단편의 기능이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 미치도록 하는 단일한 핵산 단편에 대한 2개 이상의 핵산 단편의 회합을 의미한다. 예를 들어, 프로모터는 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 경우(즉, 코딩서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우)에 코딩서열과 작동가능하게 연결된다. 코딩서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0075] 트랜스진의 코딩 영역은 특정 세포 유형에 대한 코돈 사용빈도를 최적화시키기 위해 하나 이상의 잠재적 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, I2S 트랜스진의 코돈은 척추동물 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, I2S 트랜스진의 코돈은 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, I2S 트랜스진의 코돈은 인간 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다.

[0076] 임의로, 구조체(construct)는 하기 중 하나 이상과 같은 추가 성분을 함유할 수 있다: 스플라이스 부위, 인헨서 서열, 적절한 프로모터의 조절 하에서의 선택가능한 마커 유전자, 적절한 프로모터의 조절 하에서의 증폭가능한 마커 유전자, 및 기질 부착 영역(MAR) 또는 삽입되는 영역의 발현을 향상시키는 당 분야에 공지된 다른 성분.

[0077] 숙주 세포로 트랜스펙션되거나 형질도입된 후, 적합한 벡터는 염색체외적(에피솜적)으로 발현할 수 있거나, 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있다.

[0078] <u>재조합 I2S 단백질의 활성화</u>

[0079] 통상적으로, 재조합 I2S 효소는 2-아미노-3-옥소프로피온산, 또는 옥소-알라닌으로도 공지된 포르밀글리신에 대한 보존된 시스테인(성숙 인간 I2S의 아미노산 59에 상응함)의 번역 후 변형에 의해 활성화된다. 이러한 번역 후 변형은 포르밀글리신 생성 효소(FGE)로 공지된 효소에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 I2S 효소는 FGE 단백질을 또한 발현하는 세포에서 생성된다. 특정 구체예에서, 재조합 I2S 효소는 FGE 단백질의 증가되거나 향상된 발현을 갖는 세포에서 생성된다. 예를 들어, 세포는 높은 수준의 활성 효소를 갖는 I2S 제조물의 생성을 촉진하기 위해 재조합 I2S와 함께 FGE를 과다발현하도록 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, FGE의 과다-발현은 표준 재조합 기술을 이용하여 외인성 FGE의 발현(예를 들어, 과다-발현)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, FGE의 과다-발현은, 예를 들어, 내인성 FGE 유전자의 프로모터를 활성화시키거나 향상시킴으로써 내인성 FGE의 활성화되거나 향상된 발현에 의해 달성된다. 일부 경우에, 핵산 엔코딩 재조합 I2S 및 핵산 엔코딩 재조합 FGE 단백질은 내부 리보솜 진입 부위에 상응하는 서열을 갖는 핵산(예를 들어, 스페이서 서열)에 의해 연결된다.

[0080] 시스테인을 포르밀글리신으로 전환시키는 성능을 갖는 임의의 FGE가 본 발명에 사용될 수 있다. FGE 단백질에 대한 예시적 핵산 및 아미노산 서열은 US 2004-0229250호에 개시되어 있으며, 상기 서열 및 서열 자체와 관련된 전체 내용은 참조로서 본원에 포함된다. 핵산 엔코딩 재조합 FGE가 조절 서열, 유전자 조절 서열, 프로모터,

비코딩 서열 및/또는 FGE를 발현시키기 위한 다른 적절한 서열을 포함할 수 있는 것이 인지되어야 한다. 통상적으로, 코딩 영역은 상기 핵산 성분 중 하나 이상과 실시가능하게 연결된다.

[0081] <u>세포 배양 배지 및 조건</u>

[0082] 다양한 세포 배양 배지 및 조건이 재조합 I2S 단백질을 생성시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질은 혈청-함유 또는 무혈청 배지에서 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 무혈청 배지에서 생성된다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 동물 성분 비함유 배지, 즉, 동물-유래 성분이 결핍된 배지에서 생성된다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 화학적 규명 배지에서 생성된다. 본원에서 사용되는 용어 "화학적 규명 영양분 배지"는 화학적 성분의 실질적으로 모두가 공지된 배지를 의미한다. 일부 구현예에서, 화학적 규명 영양소 배지는 동물-유래 성분, 예를 들어, 혈청, 혈청 유래 단백질(예를 들어, 알부민 또는 피투인(fetuin)), 및 다른 성분을 함유하지 않는다. 일부 경우에, 화학적 규명 배지는 하나 이상의 단백질(예를 들어, 단백질 성장 인자 또는 사이토카인)을 포함한다. 일부 경우에, 화학적 규명 영양소 배지는 하나 이상의 단백질 가수분해물을 포함한다. 다른 경우에, 화학적 규명 영양소 배지는 단백질-비함유 배지, 즉, 단백질, 가수분해물 또는 공지되지 않은 조성물의 성분을 함유하지 않는 무혈청 배지이다.

[0083] 일부 구현예에서, 화학적 규명 배지는 하나 이상의 동물 유래 성분으로 보충될 수 있다. 이러한 동물 유래 성분은 송아지 태아 혈청, 말 혈청, 염소 혈청, 당나귀 혈청, 인간 혈청, 및 혈청 유래 단백질, 예를 들어, 알부민(예를 들어, 소 혈청 알부민 또는 인간 혈청 알부민)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0084] 회전병(roller bottle) 배양, 배양기 배치 배양 및 배양기 공급-배치 배양을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 세포 배양 조건이 재조합 I2S 단백질을 대규모로 생성시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 현탁 배양된 세포에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질은 부착 세포에 의해 생성된다.

[0085] 예시적 세포 배지 및 배양 조건은 실시예 섹션에 기재되어 있다. 재조합 I2S 단백질을 생성시키기 위한 추가의 예시적 방법 및 조성물은 동일 날짜에 본원과 함께 출원된 "재조합 이듀로네이트-2-설파타제를 생성시키기 위한 방법 및 조성물(Methods and Compositions for Producing Recombinant Iduronate-2-Sulfatase)"을 제목으로 하는 가출원에 기재되어 있으며, 이의 전체 개시내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0086] *재조합 I2S 단백질의 정제*

[0087] 일부 구현예에서, 본 발명은 음이온-교환크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상을 기초로 한 방법을 이용하여 불순한 제조물로부터 재조합 I2S 단백질을 정제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 6개 미만(예를 들어, 5개 미만, 4개 미만, 또는 3개 미만)의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 2, 3, 4 또는 5개의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 4개의 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 음이온-교환크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온-교환크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피의 순서로 수행한다.

[0088] *불순한 제조물*

[0089] 본원에서 사용되는 불순한 제조물은 재조합 I2S 단백질을 함유하는 처리되지 않은 생물학적 물질을 포함하는 임의의 생물학적 물질일 수 있다. 예를 들어, 불순한 제조물은 I2S 단백질을 생성하는 세포(예를 들어, 포유류 세포)로부터 분비된 재조합 I2S 단백질을 함유하는 처리되지 않은 세포 배양 배지 또는 I2S 단백질을 함유하는 미가공 세포 용해질일 수 있다. 일부 구현예에서, 불순한 제조물은 부분적으로 처리된 세포 배지 또는 세포 용해질일 수 있다. 예를 들어, 세포 배지 또는 세포 용해질은 농축되거나, 희석되거나, 바이러스 비활성화, 바이러스 처리 또는 바이러스 제거로 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 제거는 특히, 나노여과 및/또는 크로마토그래피 기술을 이용할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 비활성화는 특히, 용매 비활성화, 세제 비활성화, 저온살균, 산성 pH 비활성화, 및/또는 자외선 비활성화를 이용할 수 있다. 세포 배지 또는 세포 용해질은 또한 숙주 세포 단백질 및/또는 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA)의 수준을 감소시키기 위해 프로테아제, DNases, 및/또는 RNase로 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 처리되지 않거나 부분적으로 처리된 생물학적 물질(예를 들어, 세포 배지 또는 세포 용해질)은 동결되고, 일정 기간 동안 요망되는 온도(예를 들어, 2-8℃, -4℃, -25℃, -75℃)에서 저장된 후, 정제를 위해 해동될 수 있다. 본원에서 사용되는 불순한 제조물은 시작 물질 또는 로딩 물질로도 언급된다.

[0090] *음이온-교환크로마토그래피*

[0091] 일부 구현예에서, 재조합 I2S를 정제하기 위해 제공된 방법은 음이온-교환크로마토그래피를 포함한다. 요컨대, 음이온 교환 크로마토그래피는 음성으로 하전된 화합물과 양성으로 하전된 수지 사이의 전하-전하 상호작용에 의존하는 크로마토그래피 기술이다. 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피는 강한 음이온-교환크로마토그래피이다. 일부 구현예에서, 음이온-교환크로마토그래피는 치료 단백질(예를 들어, 재조합 I2S)에 대한 첫번째 정제 단계로서 이용된다.

[0092] 예시적 음이온 교환 수지는 4차 아민 수지 또는 "Q-수지"(예를 들어, Capto™-Q, Q-Sepharose®, QAE Sephadex®); 디에틸아미노에탄(DEAE) 수지(예를 들어, DEAE-Trisacryl®, DEAE Sepharose®, 벤조일화 나프토일화 DEAE, 디에틸아미노에틸 Sephacel®; Amberjet® 수지; Amberlyst® 수지; Amberlite® 수지(예를 들어, Amberlite® IRA-67, Amberlite® 강 염기성, Amberlite® 약 염기성), 콜레스티라민 수지, ProPac® 수지(예를 들어, ProPac® SAX-10, ProPac® WAX-10, ProPac® WCX-10); TSK-CEL® 수지(예를 들어, TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); 및 Acclaim® 수지를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 음이온 교환 수지는 Q 수지이다.

[0093] 음이온 교환 크로마토그래피를 위한 통상적 이동상은 비교적 극성인 용액, 예를 들어, 물, 아세토니트릴, 유기 알콜, 예를 들어, 메탄올, 에탄올, 및 이소프로판올, 또는 2-(N-모르폴리노)-에탄설폰산(MES)을 함유하는 용액을 포함한다. 따라서, 특정 구체예에서, 이동상은 약 0%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100% 극성 용매를 포함한다. 특정 구체예에서, 이동상은 분리 과정 동안 임의의 제공된 시간에서 약 1% 내지 약 100%, 약 5% 내지 약 95%, 약 10% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 70%, 또는 약 40% 내지 약 60% 극성 용액을 포함한다.

[0094] 일반적으로, 이동상은 염을 포함한다. 예를 들어, 염(예를 들어, 염화나트륨)은 음이온 교환 컬럼으로부터 결합된 단백질을 용출시킬 수 있다(예를 들어, 반대이온은 클로라이드이고, 이는 이후에 방출되는 표적 단백질을 교환시킨다). 일부 구현예에서, 이동상은 약 0 내지 약 1.0M, 예를 들어, 약 0 내지 약 0.8M, 약 0 내지 약 0.6M, 약 0 내지 약 0.5M, 약 0 내지 약 0.4M, 약 0.05M 내지 약 0.50M, 약 0.10M 내지 약 0.45M, 약 0.10M 내지 약 0.40M, 또는 약 0.15M 내지 약 0.40M의 염 농도를 포함한다. 일부 구현예에서, 이동상은 약 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, 또는 1.0M의 염 농도를 포함한다. 일부 구현예에서, 이동상 중의 염 농도는 구배(예를 들어, 선형 또는 비-선형 구배)이다. 일부 구현예에서, 이동상 중의 염 농도는 일정하다. 일부 구현예에서, 이동상 중의 염 농도는 단계적으로 증가되거나 감소될 수 있다.

[0095] 통상적으로, 이동상은 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 완충되지 않는다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 14의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 10의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 7의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 6.5의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10의 pH로 완충된다.

[0096] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 통과액은 음이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, Q 컬럼)으로의 로딩 전에 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 또는 7.5의 pH 및 약 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, 또는 20 mS/cm의 전도율로 조정된다. pH는 소듐 아세테이트(예를 들어, 1M)를 이용하여 조정될 수 있고, 전도율은 염화나트륨(예를 들어, 5M)을 이용하여 조정될 수 있다. 로딩 후, 음이온-교환크로마토그래피 컬럼은 약 5.0-7.5의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 또는 7.5)와 함께 약 140 mM 내지 약 200 mM 범위의 염(예를 들어, NaCl) 농도(예를 들어, 약 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM, 또는 200 mM)를 포함하는 세척 완충액을 이용하여 세척될 수 있다. 음이온-교환크로마토그래피 컬럼은 선형 NaCl 구배를 포함하는 용출 완충액을 이용하여 용출될 수 있다. 적합한 예시적 선형 NaCl 구배는 약 0-500 mM 범위의 NaCl (예를 들어, 약 0-400 mM, 약 0-350 mM, 약 0-300 mM, 약 50-500 mM, 약 150-500 mM, 약 150-450 mM, 약 150-400 mM)을 함유할 수 있다.

[0097] *양이온 교환 크로마토그래피*

[0098] 일부 구현예에서, 재조합 I2S를 정제하기 위해 제공된 방법은 양이온-교환크로마토그래피를 포함한다. 요컨대, 양이온 교환 크로마토그래피는 양성으로 하전된 화합물과 음성으로 하전된 수지 사이의 전하-전하 상호작용에 의존하는 크로마토그래피 기술이다. 일부 구현예에서, 양이온-교환크로마토그래피는 강한 양이온-교환크로마토그래피이다.

[0099] 양이온 교환 크로마토그래피는 일반적으로 설포뉴 이온을 함유하는 강하거나 약한 양이온 교환 컬럼으로 실시되거나, 보통 카르복시메틸(CM) 또는 카르복실레이트(CX) 작용기를 갖는 약한 양이온 교환기로 실시된다. 많은 적합한 양이온 교환 수지는 당 분야에 공지되어 있고, 시판되며, 이는 SP-Sepharose®, CM Sepharose®; Amberjet® 수지; Amberlyst® 수지; Amberlite® 수지(예를 들어, Amberlite® IRA120); ProPac® 수지(예를 들어, ProPac® SCX-10, ProPac® WCX-10, ProPac® WCX-10); TSK-GEL® 수지(예를 들어, 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, 및 TSKgel CM-STAT); 및 Acclaim® 수지를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 음이온 교환 수지는 SP-Sepharose 수지®이다.

[0100] 양이온 교환 크로마토그래피에 대한 통상적인 이동상은 비교적 극성의 용액, 예를 들어, 물, 아세토니트릴, 유기 알콜, 예를 들어, 메탄올, 에탄올, 및 이소프로판올, 또는 2-(N-모르폴리노)-에탄설폰산(MES)을 함유하는 용액을 포함한다. 따라서, 특정 구체예에서, 이동상은 약 0%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 극성 용액을 포함한다. 특정 구체예에서, 이동상은 분리 과정 동안 임의의 제공된 시간에서 약 1% 내지 약 100%, 약 5% 내지 약 95%, 약 10% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 70%, 또는 약 40% 내지 약 60%의 극성 용액을 포함한다.

[0101] 일반적으로, 이동상은 염을 포함한다. 예를 들어, 염(예를 들어, 염화나트륨, 인산 나트륨 등)은 양이온 교환 컬럼으로부터 결합된 단백질을 용출시킬 수 있다(예를 들어, 반대이온은 소듐이고, 이는 이후에 방출되는 표적 단백질을 교환시킨다). 일부 구현예에서, 이동상은 약 0 내지 약 1.0M, 예를 들어, 약 0 내지 약 0.8M, 약 0 내지 약 0.6M, 약 0 내지 약 0.5M, 약 0 내지 약 0.4M, 약 0.05M 내지 약 0.50M, 약 0.10M 내지 약 0.45M, 약 0.10M 내지 약 0.40M, 또는 약 0.15M 내지 약 0.40M의 염 농도를 포함한다. 일부 구현예에서, 이동상은 약 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, 또는 1.0M의 염 농도를 포함한다. 일부 구현예에서, 이동상 내의 염 농도는 구배(예를 들어, 선형 또는 비-선형 구배)이다. 일부 구현예에서, 이동상 내의 염 농도는 일정하다. 일부 구현예에서, 이동상 내의 염 농도는 단계적으로 증가되거나 감소될 수 있다.

[0102] 통상적으로, 이동상은 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 완충되지 않는다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 14의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 10의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5 내지 약 7의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 6.5의 pH로 완충된다. 특정 구체예에서, 이동상은 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10의 pH로 완충된다.

[0103] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 양이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, SP 컬럼)으로의 로딩 전에 약 1 mS/cm 내지 20 mS/cm 범위의 전도율(예를 들어, 약 1 mS/cm 내지 15 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 10 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 8 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 6 mS/cm, 약 1 mS/cm 내지 4 mS/cm, 약 2 mS/cm 내지 4 mS/cm)로 조정된다. 특정 구체예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 양이온-교환크로마토그래피 컬럼(예를 들어, SP 컬럼)으로의 로딩 전에 약 2 mS/cm 내지 4 mS/cm 범위의 전도율(예를 들어, 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4 mS/cm)로 조정된다. 전도율은 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액을 H_2O로, 예를 들어, 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, 또는 10:1의 비로 희석시킴으로써 조정될 수 있다. 전도율은 또한 요망되는 완충액으로의 정용여과에 의해 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 양이온-교환크로마토그래피 컬럼은 약 5.0-6.5의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0 또는 6.5)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 양이온-교환크로마토그래피 컬럼은 약 0.01 M 내지 약 0.1 M 범위의 포스페이트(예를 들어, NaPO4) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 0.1 M)를 포함하는 완충액으로 수행된다. 일부 구현예에서, 적합한 pH는 약 5.0-6.5(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 또는 6.5)이다.

[0104] *혼합 모드 크로마토그래피*

[0105] 수산화아파타이트 크로마토그래피(HA)는 "슈도-친화성(Pseudo-affinity)" 또는 "혼합-모드" 이온 크로마토그래피인 것으로 간주되고, 이는 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 수산화아파타이트는 생물학적 분자의 분획화 및 정제에 사용되는 칼슘 포스페이트의 독특한 형태이다. 일부 경우에, 결정성 수산화아파타이트가 사용될 수 있으나, 결정의 취약성은 유속 및/또는 컬럼 수명을 제한할 수 있다. 2 유형의 화학적으로 순수한 세라믹 수산화아파타이트, CHT 세라믹 수산화아파타이트 타입 I 및 II는 매크로다공성 구체이며, 이는 높은 유속 및 압력에서 사용될 수 있다. 타입 I은 일반적으로 높은 단백질 결합 성능을 갖는 반면, 타입 II는 일반적으로 단백질에 대해 낮은 결합 성능을 갖는다. 일반적으로, 수산화아파타이트의 화학식은 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$(Kawasaki, et al 1985)이다. 작용기는 결정 칼슘 이온(C-부위)의 양성으로 하전된 쌍 및 결정 포스페이트(P-부위)의 트리플렛(triplet)과 회합된 6개의 음성으로 하전된 산소 원자의 클러스터를 포함한다. C-부위, P-부위 및 하이드록실은 결정 표면 상에 고정된 패턴으로 분배되며, 이는 일반적으로 단백질 및 다른 분자와의 복잡한 상호작용을 야기시킨다.

[0106] 샘플은 중성 pH 또는 중성에 가까운 pH의 낮은 이온 강도의 포스페이트 완충액(예를 들어, 1-10 mM 소듐 또는 포타슘 포스페이트) 중에서 HA 컬럼에 로딩될 수 있다. 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 컬럼 통과액은 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)으로의 로딩 전에 약 0.001 M 내지 약 0.01 M 범위의 포스페이트 (예를 들어, NaPO4) 농도(예를 들어, 약 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, 또는 0.01 M) 및 약 5.0-6.5의 pH(예를 들어, 약 5.0, 5.5, 6.0, 또는 6.5)로 조정된다. 로딩된 HA 컬럼은 통상적으로 로딩 완충액의 포스페이트 농도와 동등한 포스페이트 농도를 갖는 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 로딩 후 중성 pH 또는 중성에 가까운 pH의 포스페이트(예를 들어, 1-10 mM 소듐 또는 포타슘 포스페이트)을 함유하는 세척 완충액으로 세척된다. 예를 들어, 적합한 세척 완충액은 약 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 또는 10 mM의 포스페이트 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 보다 엄격한 세척 조건을 발생시키기 위해 세척 완충액 중의 포스페이트의 양을 증가시키는 것이 요망될 수 있다. I2S 단백질의 표면 상의 M6P 수준, 특히, 디-M6P 수준이 리소좀 표적화에 중요한 것이 고려된다. 세척 완충액 중의 증가된 포스페이트 농도는 선택적으로 HA 컬럼 상에 높은 수준의 M6P, 특히, 디-M6P를 갖는 I2S 단백질을 보유할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 요망되는 세척 완충액은 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM 또는 이를 초과하는 포스페이트 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 로딩된 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 약 10-20 mM 범위의 포스페이트 농도(예를 들어, 약 10-18 mM, 10-16 mM, 10-15 mM, 12-20 mM, 14-18 mM, 14-16 mM)를 갖는 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 로딩된 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)은 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM 또는 이를 초과하는 포스페이트 농도를 갖는 세척 완충액으로 세척된다.

[0107] HA 컬럼으로부터의 용출은 통상적으로 구배 포스페이트 완충액으로 달성된다. 예를 들어, 적합한 용출 완충액은 약 1-400 mM(예를 들어, 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)의 인산 나트륨의 포스페이트 구배를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, HA 컬럼으로부터의 용출은 용출 완충액 중의 포스페이트 농도를 단계적으로 증가시킴으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 단계적 용출 완충액은 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 mM로부터 선택된 포스페이트 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, HA 컬럼)으로부터의 용출은 약 50 mM 내지 약 150 mM 범위의 포스페이트(예를 들어, 인산 나트륨) 농도(예를 들어, 약 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 및 이의 조합의 포스페이트(예를 들어, 인산 나트륨) 농도로부터 선택됨)를 갖는 용출 완충액에 의해 달성된다.

[0108] HA 크로마토그래피를 위한 조건의 많은 다양한 조합이 공지되어 있고, 파라미터를 특정 관심 단백질(예를 들어, 재조합 I2S)에 적합하게 되도록 조정하는데 사용될 수 있음이 인지될 것이다.

[0109] *소수성 상호작용 크로마토그래피*

[0110] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 단백질을 또 다른 단백질로부터 분리시키기 위해 소수성의 특성을 이용하는 분리 기술이다. 상기 유형의 크로마토그래피에서, 페닐, 옥틸, 또는 부틸과 같은 소수성 기가 정지 컬럼에 부착된다. 표면 상에 소수성 아미노산 측쇄를 갖는 컬럼을 통해 통과하는 단백질은 컬럼 상의 소수성 기와

상호작용하고 이에 결합할 수 있다. HIC 컬럼이 공지되어 있고, 이는, 예를 들어, 페닐 세파로오스(Phenyl Sepharose)를 포함한다.

[0111] HIC 분리는 종종 이온 교환 크로마토그래피에서 사용되는 조건의 반대 조건을 이용하도록 디자인된다. 일반적으로, 높은 이온 강도를 갖는 완충액, 보통 암모늄 설페이트가 먼저 컬럼에 적용된다. 완충액 내의 염은 샘플 용질의 용매화를 감소시키고, 이에 따라 용매화가 감소하고, 노출되는 소수성 영역이 배지에 의해 흡착된다. 정지상은 일반적으로 다른 분자와 소수성 상호작용을 형성하도록 디자인된다. 이러한 상호작용은 일반적으로 물에서 너무 약하나, 완충액으로의 염(예를 들어, Na_2SO_4, K_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, NH_4Cl, NaBr, 및 NaSCN)의 첨가는 소수성 상호작용을 발생시킨다. 일부 구현예에서, 이동상은 약 0.1M 내지 약 3.0M, 예를 들어, 약 0.1M 내지 약 1.5M, 약 0.2M 내지 약 0.8M, 또는 약 0.3M 내지 약 0.5M의 염 농도를 포함한다.

[0112] 특정 구현예에서, 이동상은 완충된다. 특정 구현예에서, 이동상은 완충되지 않는다. 특정 구현예에서, 이동상은 pH 약 5 내지 약 14로 완충된다. 특정 구현예에서, 이동상은 pH 약 5 내지 약 10로 완충된다. 특정 구현예에서, 이동상은 pH 약 5 내지 약 7로 완충된다. 특정 구현예에서, 이동상은 pH 약 5.0로 완충된다.

[0113] 일부 구현예에서, 불순한 제조물 또는 중간 용출액 또는 통과액은 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼(예컨대, 페닐 컬럼)으로 로딩되기 전에 pH 약 4.5-6.0 (예컨대, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.5 M 내지 약 2.0 M(예컨대, 약 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, 또는 2.0 M) 범위의 염(예컨대, NaCl) 농도로 조절된다. 로딩되면, 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼은 pH 약 4.5-6.0 (예컨대, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.5 M 내지 약 2.0 M(예컨대, 약 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, 또는 2.0 M) 범위의 염(예컨대, NaCl) 농도를 포함하는 세척 완충제를 사용하여 세척될 수 있다. 일부 구현예에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피 컬럼은 pH 약 4.5-6.0(예컨대, 약 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0)에서 약 0.1 M 내지 약 0.5 M (예컨대. 약 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 또는 0.5 M) 범위의 염 (예컨대, NaCl) 농도를 포함하는 용출 완충제를 사용하여 용출된다.

[0114] *정제된 I2S 단백질의 특성화*

[0115] 정제된 재조합 I2S 단백질은 여러 방법을 사용하여 특성화될 수 있다.

[0116] 순도

[0117] 정제된 재조합 I2S 단백질의 순도는 전형적으로 최종 생성물에 존재하는 여러 불순물(예컨대, 숙주 세포 단백질 또는 숙주 세포 DNA)의 수준에 의해 측정된다. 예를 들어, 숙주 세포 단백질(HCP)의 수준은 ELISA 또는 SDS-PAGE에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질은 150 ng HCP/mg I2S 미만의 단백질(예컨대, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 30, 20, 10 ng HCP/mg I2S 미만의 단백질)을 함유한다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질을 염색법(silver staining)으로 SDS-PAGE 처리하는 경우, 0.05%, 0.01%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, 0.3%, 0.35%, 0.4%, 0.45%, 또는 0.5% 검정 대조군보다 더 큰 강도를 가지는 새로운 밴드를 갖지 않는다. 여러 검정 대조군이 사용될 수 있으며, 특히, FDA와 같은 규제 청이 허용하는 것들이 사용될 수 있다.

[0118] 특이적 활성

[0119] 또한, 정제된 재조합 I2S 단백질은 기능적 및/또는 생물학적 활성을 평가함으로써 특성화될 수 있다. 재조합 I2S 조성물의 효소 활성은 당해 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 전형적으로, 이들 방법은 설페이트 방출 검정으로서 공지되어 있는, 합성 기질로부터의 설페이트 제거를 검출하는 것을 포함한다. 효소 활성 검정의 일례는 이온 크로마토그래피의 사용을 포함한다. 이 방법은 기질로부터 재조합 I2S에 의해 효소적으로 방출되는 설페이트 이온의 양을 정량화하는 것이다. 기질은 천연 기질 또는 합성 기질일 수 있다. 몇몇 경우에, 기질은 헤파린 설페이트 (예컨대, 헤파린 디사카라이드), 더마탄 설페이트, 또는 이의 기능적 등가물이다. 전형적으로, 방출된 설페이트 이온은 전도도 검출기가 구비된 이온 크로마토그래피에 의해 분석된다. 이러한 예에서, 결과는 U/단백질의 mg으로서 표현될 수 있으며, 1 유닛(Unit)은 기질로부터 시간 당 1 μmole 설페이트 이온을 방출시키는데 요구되는 효소의 양으로서 정의된다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질은, 기질로서 헤파린 디사카라이드를 사용하는 시험관내 설페이트 방출 활성 검정에 의해 측정되는 경우, 약 0-100 U/mg, 약 10-100 U/mg, 약 10-80 U/mg, 약 20-80 U/mg, 약 20-70 U/mg, 약 20-60 U/mg, 약 20-50 U/mg, 약 30-100 U/mg, 약 30-90 U/mg, 약 30-80 U/mg, 약 30-70 U/mg, 약 30-60 U/mg, 약 40-100 U/mg, 약 40-90 U/mg, 약 40-80 U/mg, 약 40-70 U/mg, 약 40-60 U/mg 범위의 특이적 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질은, 기질로서 헤파린 디사카라이드를 사용하는 시험관내 설페이트 방출 활성 검정에 의해 측

정되는 경우, 약 5 U/mg, 약 10 U/mg, 약 15 U/mg, 약 20 U/mg, 약 25 U/mg, 약 30 U/mg, 약 35 U/mg, 약 40 U/mg, 약 45 U/mg, 약 50 U/mg, 약 55 U/mg, 약 60 U/mg, 약 65 U/mg, 약 70 U/mg, 약 75 U/mg, 약 80 U/mg, 약 85 U/mg, 약 90 U/mg, 약 95 U/mg, 또는 약 100 U/mg 이상의 특이적 활성을 갖는다. 기질로서 헤파린 디사카라이드를 사용하는 시험관내 설페이트 방출 활성 검정을 수행하기 위한 예시적인 조건이 하기에 제시된다. 전형적으로, 이 검정은 천연 유래된 기질인 헤파린 디사카라이드로부터 설페이트 이온을 방출시키는 I2S의 성능을 측정한다. 방출된 설페이트는 이온 크로마토그래피에 의해 정량화될 수 있다. 몇몇 경우에, 이온 크로마토그래피에 전도도 검출기가 구비된다. 비제한적 예로서, 샘플을 먼저 10mM Na 아세테이트, pH 6으로 완충제 교환시켜 제형 완충제 중의 포스페이트 이온에 의한 억제를 제한한다. 이후, 샘플은 반응 완충제(10mM Na 아세테이트, pH 4.4)를 사용하여 0.075 mg/ml로 희석되고, 30㎕ 반응 부피에서 0.3 ㎍ I2S/100 ㎍ 기질의 효소 대 기질 비로 헤파린 디사카라이드와 함께 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션된다. 이후, 이 반응은 3분 동안 100℃에서 샘플을 가열함으로써 중단된다. IonPac AG18 guard 컬럼과 함께 Dionex IonPac AS18 분석 컬럼을 사용하여 분석이 수행된다. 15분 동안 1.0 mL/min로 30 mM 수산화칼륨에 의한 동용매 (isocratic) 방법이 사용된다. I2S 샘플에 의해 방출된 설페이트의 양은 1.7 내지 16.0 nmole 범위에서 설페이트 표준의 선형 회귀 분석으로부터 계산된다. 기록가능한 값이 단백질 1mg에 대한 유닛으로서 표현되며, 여기서 1 유닛은 시간 당 방출된 1μmole의 설페이트로서 정의되고, 단백질 농도는 A280 측정에 의해 결정된다.

[0120] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 단백질의 효소 활성은 또한 예를 들어, 4-메틸움벨리페릴-설페이트(4-methylumbelliferyl-sulfate)의 설페이트 및 천연 형광 4-메틸움벨리페론 (4-methylumbelliferone: 4-MUF)으로의 가수분해를 측정하는 4-MUF 검정과 같은 당해 공지된 여러 다른 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 시험관내 4-MUF 검정으로 측정되는, 생산된 재조합 I2S 단백질의 요망되는 효소 활성은 약 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, 또는 20 U/mg 이상이다. 일부 구현예에서, 시험관내 4-MUF 검정으로 측정되는, 생산된 재조합 I2S 단백질의 요망되는 효소 활성은 약 0-50 U/mg (예컨대, 약 0-40 U/mg, 약 0-30 U/mg, 약 0-20 U/mg, 약 0-10 U/mg, 약 2-50 U/mg, 약 2-40 U/mg, 약 2-30 U/mg, 약 2-20 U/mg, 약 2-10 U/mg, 약 4-50 U/mg, 약 4-40 U/mg, 약 4-30 U/mg, 약 4-20 U/mg, 약 4-10 U/mg, 약 6-50 U/mg, 약 6-40 U/mg, 약 6-30 U/mg, 약 6-20 U/mg, 약 6-10 U/mg)의 범위이다. 시험관내 4-MUF 검정을 수행하기 위한 예시적인 조건이 하기에 제시된다. 전형적으로, 4-MUF 검정은 4-메틸움벨리페릴-설페이트 (4-MUF-SO4)를 설페이트 및 천연 형광 4-메틸움벨리페론 (4-MUF)으로 가수분해시키는 I2S 단백질의 성능을 측정한다. 1 밀리유닛의 활성은 37℃에서 1분 내에 1 나노몰의 4-MUF-SO_4를 4-MUF로 전환시키는데 요구되는 효소의 양으로서 정의된다. 전형적으로, 공지된 활성을 갖는 I2S 시험 샘플에 의해 생성된 평균 형광 유닛(MFU)이 표준 곡선을 생성하는데 사용될 수 있으며, 이것이 관심있는 샘플의 효소 활성을 계산하는데 사용될 수 있다. 따라서, 효소 활성을 단백질 농도로 나눔으로써 특이적 활성이 계산될 수 있다.

[0121] 다른 예에서, 재조합 I2S 조성물의 단백질 농도는 단백질 농도를 측정하기 위한 당해 공지되어 있는 어떠한 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 몇몇 경우에, 단백질 농도는 자외선 흡광도 검정에 의해 측정된다. 이러한 흡광도 검정은 전형적으로 약 280 nm 파장(A_{280})에서 수행된다.

[0122] <u>전하 프로파일</u>

[0123] 정제된 재조합 I2S은 단백질과 관련된 전하 프로파일에 의해 특성화될 수 있다. 전형적으로, 단백질 전하 프로파일은 전형적으로 단백질의 표면 상에 존재하는 잔기 측쇄 전하의 패턴을 반영한다. 전하 프로파일은 단백질에 대한 이온 교환 (IEX) 크로마토그래피 (예컨대, HPLC) 검정을 수행함에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, "전하 프로파일"은 교환 이온을 함유하는 이동상의 컬럼으로의 첨가 후 소정 시점에서 이온 교환 컬럼으로부터 용출되는 단백질의 양을 나타내는 일련의 값을 나타낸다.

[0124] 전형적으로, 적합한 이온 교환 컬럼은 음이온 교환 컬럼이다. 예를 들어, 전하 프로파일은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템을 사용하는 강한(strong) 음이온 교환 (SAX) 크로마토그래피에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 재조합 I2S는 강한 음이온 교환 컬럼의 고정된 양전하 상에 흡착되고, 증가하는 이온 강도의 구배는 소정 유속에서 이동상을 사용하여 양으로 하전된 컬럼과 재조합 I2S 종과의 이온 상호작용 강도에 비례하여 컬럼으로부터 재조합 I2S 종을 용출시킨다. 음으로 보다 많이 하전된 (보다 산성) I2S 종은 음으로 보다 적게 하전된 (덜 산성) I2S 종보다 더 늦게 용출된다. 용출액 중 단백질의 농도는 자외선 흡광도(280 nm에서)에 의해 검출된다.

[0125] 일부 구현예에서, 재조합 I2S는 20 mM TRIS-HCl 중 약 pH 8.0에서 Mini Q PE 컬럼의 고정된 양전하 상에 흡착

되고, 증가하는 이온 강도의 구배는 20 mM TRIS-HCL, 1 M 염화나트륨, pH 8.0로 이루어진 이동상을 0.8 ml/min의 유속에서 사용하여 양으로 하전된 컬럼과 재조합 I2S 종과의 이온 상호작용 강도에 비례하여 컬럼으로부터 재조합 I2S 종을 용출시킨다.

[0126] 일부 구현예에서, 전하 프로파일은 HPLC 컬럼으로부터 용출 후 시간에 대한 흡광도 유닛의 크로마토그램(chromatogram)에 의해 도시될 수 있다. 크로마토그램은 하나 이상의 피크를 포함할 수 있으며, 그러한 세트 중 각각의 피크는 유사한 표면 전하를 갖는 조성물의 재조합 I2S의 아집단(subpopulation)을 확인하게 한다.

[0127] 일부 구현예에서, 정제된 I2S 단백질 조성물은 전하 프로파일내 6개 이상의 피크를 나타낸다. I2S의 예시적 전하 프로파일이 실시예 섹션 및 도 11에 묘사되어 있다. 도 11에 도시된 바와 같이, 6개의 피크는 크로마토그램의 전체 피크 면적에 대한 기여도를 감소시키고 음전하는 증가시키는 순으로 표지되어 있다(A에서 F로). 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 조성물에 대한 전하 프로파일은 단백질 표면 상의 음전하 또는 양전하의 양에 기초하여 상이한 피크 개수, 크기, 모양 또는 시간 간격을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S 조성물은 6개 미만(예컨대, 5, 4, 3, 또는 2개 미만)의 피크를 갖는 전하 프로파일을 갖는다. 일부 구현예에서, 재조합 I2S의 전하 프로파일은 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 피크(들)을 가질 수 있다. 예를 들어, 피크 A, B, C, D, E, 및 F 중 어느 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 피크가 정제된 재조합 I2S 단백질 조성물 중에 부재하거나 감소될 수 있다. 전형적으로, 전하 프로파일은 보다 적은 피크가 존재하는 경우 보다 더 균질한 것으로 간주된다.

[0128] <u>글리칸 맵핑(Glycan Mapping)</u>

[0129] 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질은 전형적으로 글리칸 맵핑으로서 일컬어지는, 이들의 프로테오글리칸(proteoglycan) 조성에 의해 특성화될 수 있다. 어떠한 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 분지 구조의 모양 및 복잡성과 함께 글리칸 연결은 생체내 소실(clearance), 리소좀 표적화, 생체이용률 및/또는 효능에 영향을 미칠 수 있는 것으로 여겨진다.

[0130] 전형적으로, 글리칸 맵은 효소 분해 및 이후 크로마토그래피 분석에 의해 결정될 수 있다. 적합한 글리코실라제, 펩티다제(예컨대, 엔도펩티다제, 엑소펩티다제), 프로테아제, 및 포스파타제를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아닌 여러 효소가 효소 분해에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 효소는 알칼린 포스파타제이다. 일부 구현예에서, 적합한 효소는 뉴라미니다제(neuraminidase)이다. 글리칸(예컨대, 포스포글리칸)은 크로마토그래피 분석에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 포스포글리칸은 펄스형 암페로메트리 검출법(Pulsed Amperometric Detection)과 함께 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAE-PAD) 또는 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 검출될 수 있다. 글리칸 맵 상에서 각각의 피크에 의해 표현되는 글리칸(예컨대, 포스포글리칸)의 양은 당 분야에 공지되어 있고 본원에 기술되어 있는 방법들에 따라 글리칸(예컨대, 포스포글리칸)의 표준 곡선을 사용하여 산출될 수 있다.

[0131] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 I2S는 각각 중성(피크 그룹 1), 모노시알릴레이티드 (피크 그룹 2), 디시알릴레이티드 (피크 그룹 3), 모노포스포릴레이티드 (피크 그룹 4), 트리시알릴레이티드 (피크 그룹 5), 테트라시알릴레이티드 (피크 그룹 6), 및 디포스포릴레이티드 (피크 그룹 7) I2S 단백질을 나타내는 7개의 피크 그룹을 포함하는 글리칸 맵을 나타낸다. I2S의 예시적인 글리칸 맵이 도 10에 도시되어 있다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S는 7개 미만의 피크 그룹을 갖는 글리칸 맵(예컨대, 6, 5, 4, 3, 또는 2개의 피크 그룹을 갖는 글리칸 맵)을 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S은 7개 초과의 피크 그룹(예컨대, 8, 9, 10, 11, 12 또는 그 초과)을 갖는 글리칸 맵을 갖는다.

[0132] 각각의 피크 그룹에 상응하는 글리칸의 상대적 양은 사전 설정된 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대한 상기 피크 그룹 면적에 기반하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 1 (중성)은 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 40-120% (예컨대, 약 40-115%, 약 40-110%, 약 40-100%, 약 45-120%, 약 45-115%, 약 45-110%, 약 45-105%, 약 45-100%, 약 50-120%, 약 50-110%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 2 (모노시알릴레이티드)은 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 80-140% (예컨대, 약 80-135%, 약 80-130%, 약 80-125%, 약 90-140%, 약 90-135%, 약 90-130%, 약 90-120%, 약 100-140%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 3 (디시알릴레이티드)은 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 80-110% (예컨대, 약 80-105%, 80-100%, 약 85-105%, 약 85-100%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 4 (모노포스포릴레이티드)는 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 100-550% (예컨대, 약 100-525%, 약 100-500%, 약 100-450%, 약 150-550%, 약 150-500%, 약 150-450%, 약 200-550%, 약 200-500%, 약 200-450%,

약 250-550%, 약 250-500%, 약 250-450%, 또는 약 250-400%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 5 (트리시알릴레이티드)는 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 70-110% (예컨대, 약 70-105%, 약 70-100%, 약 70-95%, 약 70-90%, 약 80-110%, 약 80-105%, 약 80-100%, 또는 약 80-95%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 6 (테트라시알릴레이티드)은 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 90-130% (예컨대, 약 90-125%, 약 90-120%, 약 90-115%, 약 90-110%, 약 100-130%, 약 100-125%, 또는 약 100-120%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 피크 그룹 7 (디포스포릴레이티드)은 참조 표준에서의 상응하는 피크 그룹 면적에 대해 약 70-130% (예컨대, 약 70-125%, 약 70-120%, 약 70-115%, 약 70-110%, 약 80-130%, 약 80-125%, 약 80-120%, 약 80-115%, 약 80-110%, 약 90-130%, 약 90-125%, 약 90-120%, 약 90-115%, 약 90-110%) 범위의 피크 그룹 면적을 가질 수 있다. 글리칸 맵핑에 대한 여러 참조 표준은 당 분야에 공지되어 있으며, 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 피크 그룹 7 (디포스포릴레이티드)은 정제된 재조합 I2S 단백질의 표면 상의 디-M6P의 수준에 상응한다.

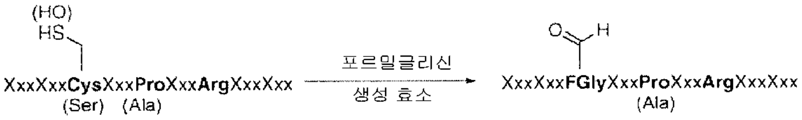
[0133] 정제된 I2S의 글리코실화 패턴은 리소좀 표적화에 영향을 미치는 것으로 고려된다. 여러 시험관내 세포 흡수 검정은 당 분야에 공지되어 있으며, 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, M6P 수용체에 의한 I2S의 흡수율을 평가하기 위해, 표면 상에서 M6P 수용체를 발현시키는 인간 섬유아세포를 사용하여 세포 흡수 검정이 실시된다. I2S의 내재화된 양은 ELISA 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 시험관내 흡수 검정에 의해 측정하는 경우, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 초과의 세포 흡수율로 특성화된다.

[0134] 펩타이드 맵핑

[0135] 일부 구현예에서, 펩타이드 맵핑은 아미노산 조성, 번역후 변형, 및/또는 세포 처리(cellular processing), 예컨대 신호 펩타이드의 절단, 포르밀글리신 전환율 및/또는 글리코실화를 특성화하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 재조합 단백질은 제어된 분해 또는 임의적 분해를 통해 이산된 펩타이드 단편으로 분해되어 패턴 또는 펩타이드 맵을 생성시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 정제된 I2S 단백질은 해석적 분석 전에 먼저 효소 분해로 처리될 수 있다. 분해는 해석적 분석 전에, 펩티다제, 글리코사이드 가수분해효소, 포스파타제, 리파제 또는 프로테아제 및/또는 이들의 조합물을 사용하여 수행될 수 있다. 펩타이드의 구조적 조성이 당 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예시적 방법으로는 질량 분광법(Mass spectrometry), 핵자기 공명법(Nuclear Magnetic Resonance(NMR)) 또는 HPLC를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0136] 포르밀글리신 전환 퍼센트

[0137] 펩타이드 맵핑은 FGly 전환 퍼센트를 측정하는데 사용될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, I2S 활성화는 하기 도시된 바와 같이 포르밀글리신 생성 효소(FGE)에 의한 시스테인(성숙 인간 I2S의 59번 위치에 해당함)의 포르밀글리신으로의 전환을 필요로 한다:



[0138]

[0139] 따라서, 포르밀글리신 전환율 (%FG)은 하기 식을 사용하여 계산될 수 있다:

$$\%FG\ (\text{of DS}) = \frac{\text{활성 I2S 분자의 수}}{(\text{활성} + \text{비활성})\ \text{I2S 분자의 총수}} \times 100$$

[0140]

[0141] %FG를 계산하기 위해, 재조합 I2S 단백질은 프로테아제 (예컨대, 트립신 또는 키모트립신)를 사용하여 짧은 펩타이드로 분해될 수 있다. 짧은 펩타이드는 예컨대, 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 분리되고 특성화될 수 있다. 성숙 인간 I2S의 59번 위치에 상응하는 위치를 함유하는 펩타이드는 대조군(예컨대, FGly 전환이 없는 I2S 단백질 또는 100% FGly 전환된 I2S 단백질)과 비교하여 59번 위치에서의 Cys가 FGly로 전환되었는지를 결정하기 위해 특성화될 수 있다. FGly를 함유하는 펩타이드의 양(활성 I2S 분자의 수에 상응함) 및 FGly 및 Cys 둘 모두를 지닌 펩타이드의 총량(전체 I2S 분자의 수에 상응함)은 상응하는 피크 면적에

기반하여 결정될 수 있으며, %FG를 반영하는 비가 산출될 수 있다.

[0142] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 약 70% 이상(예컨대, 적어도 약 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 인간 I2S (SEQ ID NO:1)의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기의 C_α-포르밀글리신 (FGly)로의 전환율을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 정제된 재조합 I2S 단백질은 실질적으로 100%의 인간 I2S (SEQ ID NO:1)의 Cys59에 상응하는 시스테인 잔기의 C_α-포르밀글리신 (FGly)로의 전환율을 갖는다.

[0143] 시알산 함량

[0144] 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질은 이들의 시알산 조성에 의해 특성화될 수 있다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 단백질 상의 시알산 잔기는 간세포(hepatocyte) 상에 존재하는 아시알로글리코단백질(asialoglycoprotein) 수용체를 통해 이들의 생체내 소실을 예방하거나, 감소시키거나 억제할 수 있는 것으로 간주된다. 따라서, 비교적 높은 시알산 함량을 갖는 재조합 단백질은 전형적으로 상대적으로 긴 생체내 순환 시간을 갖는 것으로 여겨진다.

[0145] 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질의 시알산 함량은 당 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 재조합 I2S 단백질의 시알산 함량은 효소 분해 및 이후 크로마토그래피 분석에 의해 결정될 수 있다. 효소 분해는 어떠한 적합한 시알리다제(sialidase)를 사용하여 달성될 수 있다. 몇몇 경우에, 그러한 분해는 뉴라미니다제(neuraminidase)와 같은 글리코사이드 가수분해효소에 의해 수행된다. 시알산은 펄스형 암페로메트리 검출법과 함께 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAE-PAD)와 같은 크로마토그래피 분석에 검출될 수 있다. 재조합 I2S 조성물 중 시알산의 양은 당 분야에 공지되고 본원에 기술된 방법에 따라 시알산의 표준 곡선을 사용하여 산출될 수 있다.

[0146] 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질의 시알산 함량은 16 mol/mol 초과일 수 있다. 시알산 함량과 관련하여 단위 "mol/mol"은 효소의 몰당 시알산 잔기의 몰을 나타낸다. 몇몇 경우에, 재조합 I2S 단백질의 시알산은 약 16.5 mol/mol, 약 17 mol/mol, 약 18 mol/mol, 약 19 mol/mol, 약 20 mol/mol, 약 21 mol/mol, 약 22 mol/mol 또는 그 초과이다. 일부 구현예에서, 정제된 재조합 I2S 단백질의 시알산은 약 16-20 mol/mol, 16-21 mol/mol, 약 16-22 mol/mol, 16-23 mol/mol, 16-24 mol/mol, 약 16-25 mol/mol, 약 17-20 mol/mol, 17-21 mol/mol, 약 17-22 mol/mol, 17-23 mol/mol, 17-24 mol/mol, 또는 약 17-25 mol/mol 범위 내에 있을 수 있다.

[0147] *약학적 조성물 및 투여*

[0148] 정제된 재조합 I2S 단백질은 공지된 방법에 따라 헌터 증후군 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 정제된 재조합 I2S 단백질은 정맥내, 피하, 근내, 비경구적으로, 경피적으로, 또는 경점막적으로(예컨대, 경구적으로 또는 비강내로) 전달될 수 있다.

[0149] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 정맥내 투여에 의해 피검체에게 투여된다.

[0150] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 경막내 투여에 의해 피검체에게 투여된다. 본원에서 사용되는 용어 "경막내 투여" 또는 "경막내 주입"은 척추(척수를 둘러싸는 경막내 공간)로의 주입을 나타낸다. 버홀(burrhole) 또는 뇌조(cisternal), 또는 요추 천자(lumbar puncture) 등을 통한 측뇌실 주입(lateral cerebroventricular injection)을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아닌 여러 기술이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 "경막내 투여" 또는 "경막내 전달"은 요추 영역 또는 요추 부위, 즉, 요추 IT 투여 또는 전달을 통한 IT 투여 또는 전달을 나타낸다. 본원에서 사용되는 "요추 부위" 또는 "요추 영역"은 세번째 요추와 네번째 요추 사이에 있는 영역(등 아래 부분)을 나타내며, 더욱 포괄적으로는 척추의 L2-S1 부위를 나타낸다.

[0151] 일부 구현예에서, 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 피하(즉, 피부 아래) 투여에 의해 피검체에게 투여된다. 이를 위해, 제형이 주사기를 통해 주입될 수 있다. 그러나, 주사기(예컨대, Inject-ease™ 및 Genject™ 주사기); 펜형 주사기(예컨대, GenPen™); 무바늘 장치(예컨대, MediJector™ 및 BioJector™); 및 피하 패치 전달 시스템과 같은 제형의 투여를 위한 다른 장치가 이용될 수 있다.

[0152] 일부 구현예에서, 경막내 투여는 다른 투여 경로(예컨대, 정맥내, 피하, 근내, 비경구적으로, 경피적으로, 또는 경점막적으로(예컨대, 경구적으로 또는 비강내로))와 함께 사용될 수 있다.

[0153] 본 발명은 본원에 기술된 치료적 유효량의 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물의 단독 투여 및 다중

투여를 고려한다. 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 피검체 상태(예컨대, 리소좀 저장병)의 특성, 중증도 및 정도에 기초하여 일정한 간격으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료적 유효량의 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 주기적으로 일정한 간격(예컨대, 일년 마다 한번, 6개월 마다 한번, 5개월 마다 한번, 3개월 마다 한번, 2개월마다(2개월 마다 한번), 매달(한달에 한번), 2주 마다(2주 마다 한번), 매주, 매일 또는 연속적으로)으로 투여될 수 있다.

[0154] 재조합 I2S 또는 이를 함유하는 약학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 제형화되어 약학적 조성물을 제조할 수 있다. 담체 및 치료제는 멸균될 수 있다. 제형은 투여 형태에 적합해야 한다.

[0155] 적합한 약학적으로 허용되는 담체로는 물, 염 용액(예컨대, NaCl), 염수, 완충된 염수, 알코올, 글리세롤, 에탄올, 아라비아 검(gum arabic), 식물성 오일, 벤질 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 탄수화물, 예컨대, 락토즈, 아밀로즈 또는 전분, 당, 예컨대 만니톨, 수크로즈 등, 덱스트로즈, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 규산(silicic acid), 점성 파라핀, 퍼퓸 오일(perfume oil), 지방산 에스테르, 하이드록시메틸셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈 등, 및 이들의 조합물이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다. 약학적 제제는, 요망에 따라 활성 화합물과 유해하게 반응하지 않거나 이들의 활성을 방해하지 않는, 보조제(예컨대, 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 에멀젼화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 착색제, 향료(flavoring) 및/또는 방향 물질 등)과 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 정맥내 투여에 적합한 수용성 담체가 사용된다.

[0156] 또한, 상기 조성물 또는 의약은 요망에 따라 소량의 습윤제 또는 에멀젼화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 상기 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀젼, 정제, 알약, 캡슐, 서방형 포뮬레이션, 또는 분말일 수 있다. 상기 조성물은 또한 좌약으로서 통상적인 결합제 및 담체, 예컨대 트리글리세라이드로 제형화될 수 있다. 경구 제형은 표준 담체, 예컨대 약학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 소듐 사카린, 셀룰로즈, 마그네슘 카르보네이트 등을 포함할 수 있다.

[0157] 상기 조성물 또는 의약은 인간에게 투여하기에 적합한 약학적 조성물로서 통상적인 절차에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 정맥내 투여용 조성물은 전형적으로 멸균된 등장성 수성 완충제 중의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위한 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분들은 예를 들어 활성 성분의 양을 표시하는 샤셋(sachette) 또는 앰플(ampule)과 같은 기밀 밀봉된 용기에서 물 비함유 농축물 또는 건조 동결된 분말로서 단위 투여 형태로 함께 혼합되거나 개별적으로 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 조성물은 멸균된 약학적 등급의 물, 염수, 덱스트로즈/물을 함유하는 주입병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 투여 전에 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플은 성분들이 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0158] 본원에서 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 대체적으로 본 발명의 약학적 조성물에 함유된 치료제의 총량을 기준으로 하여 결정된다. 일반적으로, 치료적 유효량은 피검체에게 유의한 이점(예컨대, 진행되는 질병 또는 상태의 치료, 조절, 치유, 예방 및/또는 개선)을 달성하기에 충분하다. 예를 들어, 치료적 유효량은 요망되는 치료적 및/또는 예방적 효과를 달성하기에 충분한 양, 예컨대 리소좀 효소 수용체 또는 이들의 활성을 조절함으로써 이러한 리소좀 저장병 또는 이의 증상을 치료(예컨대 본 발명의 조성물을 피검체에게 투여한 후 "제브라체(zebra body)"의 존재 또는 발생, 또는 세포 공포화(cellular vacuolization)의 감소 또는 제거)하기에 충분한 양일 수 있다. 일반적으로, 치료를 필요로 하는 피검체에게 투여되는 치료제(예컨대, 재조합 리소좀 효소)의 양은 피검체의 특징에 기초할 것이다. 이러한 특징으로는 피검체의 상태, 질병 중증도, 일반적인 건강상태, 연령, 성별, 및 체중이 포함된다. 당업자들은 이들 인자 및 그 밖의 관련된 인자에 기초하여 적합한 용량을 용이하게 결정할 것이다. 또한, 객관적 및 주관적 검정이 최적의 용량 범위를 확인하기 위해 임의로 사용될 수 있다.

[0159] 치료적 유효량은 통상 다수의 단위 용량을 포함할 수 있는 투여 용법(dosing regimen)으로 투여된다. 어떠한 특정 치료 단백질에 대해, 치료적 유효량(및/또는 유효 투여 용법 내 적합한 단위 용량)은 다른 약학적 작용제와 함께 예를 들어, 투여 경로에 기초하여 달라질 수 있다. 또한, 어떠한 특정 환자에 대한 특정 치료적 유효량(및/또는 단위 용량)은 치료 중인 질환 및 질환의 중증도; 사용되는 특정 약학적 작용제의 활성; 사용되는 특이적 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별 및 환자의 식이(diet); 투여 시간, 투여 경로, 및/또는 사용된 특정 융합 단백질의 배설 또는 대사; 치료 기간 등을 포함하는 다양한 인자 및 의료 분야에 널리 공지되어 있는 유사한 인자들에 기초할 수 있다.

[0160] 추가의 예시적 약학적 조성물 및 투여 방법은 PCT 공개 WO2011/163649(발명의 명칭: "이듀로네이트-2-설파타제의 CNS 전달을 위한 방법 및 조성물") 및 2012년 3월 30일자 출원된 가출원 번호 제61/618,638(발명의 명칭: "

이듀로네이트 2 설파타제의 피하 투여")(이들 모두의 전체 교시 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

[0161] 나아가, 어떠한 특정 피검체에 대해, 특정 투여 용법은 개개의 요구 및 효소 대체 요법의 투여를 관할 또는 감독하는 전문가적 개인 판단에 따라 시간 경과시 조절되어야 하고, 본원에서 언급된 그러한 용량 범위는 단지 예시적인 것이며 청구되는 발명의 범위 또는 실시를 제한하려는 것은 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0162] 도면을 함께 구성하는 하기 기재되는 도는 단지 예시를 위한 것으로, 이로 제한하는 것이 아니다.

*도 1*은 무혈청 배지에서 생성된 재조합 I2S에 대한 예시적 정제 도표를 도시한다.

*도 2*는 참조 I2S에 비한 정제된 재조합 I2S AF의 예시적 펩타이드 맵을 도시한다.

*도 3*은 정제된 재조합 I2S AF의 예시적 SDS-PAGE(실버) 분석을 도시한다.

*도 4*는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 평가된 정제된 재조합 I2S AF의 예시적 전하 프로파일 분석을 도시한다.

*도 5*는 정제된 재조합 I2S AF의 예시적 글리칸 맵 프로파일을 도시한다.

*도 6*은 재조합 I2S의 정화된 수거물의 바이러스 비활성화 UPB 단계 후의 활성(U/mg)의 예시적 분석을 도시한다.

*도 7*은 재조합 I2S의 정화된 수거물의 바이러스 비활성화 UPB 단계 후의 SEC-HPLC의 예시적 분석을 도시한다.

*도 8*은 정제된 재조합 I2S 단백질의 실버 염색으로 처리된 예시적 SDS-PAGE를 도시한다.

*도 9*는 참조에 비한 무혈청 배양 조건(상부 패널) 하에서 성장한 I2S-AF 2D 세포주로부터 생성된 정제된 재조합 I2S 효소에 대한 예시적 펩타이드 맵을 도시한다.

*도 10*은 참조에 비한 무혈청 세포 배양 조건하에서 성장한 I2S-AF 2D 및 4D 세포주를 이용하여 생성된 정제된 재조합 I2S 효소에 대해 생성된 예시적 글리칸 프로파일을 도시한다.

*도 11*은 I2S 참조 대조군에 비한 무혈청 세포 배양 조건하에서 성장한 I2S-AF 2D 세포주를 이용하여 생성된 정제된 재조합 I2S 효소에 대해 생성된 예시적 전하 프로파일을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0163] **실시예**

[0164] **실시예 1: 재조합 I2S AF 포집 및 정제 공정**

[0165] 본 실시예는 무혈청 배지 중 생산된 재조합 I2S를 포집하고 정제하기 위해 단순화된 다운스트림 정제 공정이 사용될 수 있음을 입증한다. 예시적 정제 도식이 도 1에 도시된다.

[0166] 이듀로네이트-2-설파타제 효소 (I2S) 및 포르밀글리신 생성 효소 (FGE)를 안정하게 발현시키는 세포주가 개발되었다. 예시적 세포주의 제조 및 특성화는 본원과 동일자로 출원된 미국 가출원(발명의 명칭: "재조합 이듀로네이트-2-설파타제를 생성하기 위한 세포")(전체 교시 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다. 간략하게, SEQ ID NO:2와 표시된 아미노산 서열을 지닌 인간 I2S 단백질 및 SEQ ID NO:5에 표시된 아미노산 서열을 지닌 인간 포르밀글리신 생성 효소 (FGE)를 동시 발현하도록 인간 세포주를 공학처리하였다.

[0167] SEQ ID NO: 2

[0168] 전장 전구체 이듀로네이트 2-설파타제

MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRPSLGCYGDKLV
RSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTI
PQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGEL
HANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEF
QKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIPVDFQRKIRQ
SYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATH
VPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGL
QVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNS
DKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMY
[0169] NDSQGGDLFQLLMP

[0170] SEQ ID NO:5

[0171] 전장 인간 FGE 전구체:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRP
GAHGSSAAAHRYSREANAPGPVPGERQLAHSKMVPIPAGVFTMGTDDPQIKQDGEAPA
RRVTIDAFYMDAYEVSNTEFEKFVNSTGYLTEAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAVA
AAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEW
EYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPPNGY
GLYNIVGNAWEWTSDWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYR
[0172] CAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

[0173] 전장 I2S 효소의 합성 후, 25개 아미노산 신호 펩타이드가 제거되고, 가용성 성숙 I2S 효소가 세포로부터 분비된다.

[0174] 화학적으로 규정된 배지 (무혈청/동물성분 비함유; AF)를 생물 반응기 공정에 사용하였다.

[0175] 개별 수득물의 부피가 감소되었으며, 초여과/정용여과 공정을 통해 완충제 교환되었다. 비정제된 벌크(UPB)로 불리우는, 상기 물질을 개별 수득물에 대해 -50℃에서 동결시켰다. 다운 스트림 정제 공정이 비정제된 벌크의 해동 및 풀(pool)로 시작되었으며, 성공적인 바이러스 비활성화, 음이온 교환 (Capto Q), 혼합 모드(세라믹 수산화아파타이트), 양이온 교환 (SP 세파로스) 및 소수성 상호작용(페닐 세파로스) 크로마토그래피 단계, 이후 바이러스 여과, 및 최종 농축 및 정용여과 단계를 포함하였다. 특히, 상기 정제 공정은 Q, 수산화아파타이트, SP 및 페닐 크로마토그래피 방식을 이용하였다. I2S 정제 공정에 통상적으로 사용되는 단백질 G 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피는 제외되었다. 예시적 단계가 하기 표 3에 제시된다.

[0176] 표 3: 정제 공정의 예시적 단계

수득물
UF/DF
동결 저장
해동, 푸울 및 깊이 여과 ↓ 용매/세제 바이러스 비활성화 ↓ 음이온-교환크로마토그래피 ↓ 혼합 모드크로마토그래피 ↓ ------------------- ↓ 희석(1-1.2 배) ↓ 양이온-교환크로마토그래피 ↓ 소수성 상호작용 크로마토그래피 ↓ ------------------- ↓ ------------------- ↓ 바이러스 제거 여과 ↓ UF/DF ↓ 원제(drug substance)

[0177]

[0178] 정제된 I2S 단백질을 펩타이드 맵핑, SDS-PAGE (Silver), 크기 배제 HPLC에 의해 순도를 평가하였다. 효소 특이적 활성, 포르밀글리신 함량, 시알산 함량, 글리칸 맵, 전하 프로파일을 표준 방법을 이용하여 측정하였다. 예시적 결과를 표 4에 도시한다.

[0179] 표 4: 정제된 재조합 I2S 단백질의 분석

검정		정제된 I2S (10 L 규모) 최소-최대 (n)
펩타이드 맵핑	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)
숙주 세포 단백질		≤62.5 (n=5)
SDS-PAGE (Silver)		적합
이온 교환 HPLC	피크 A%	69-69% (n=2)
	피크 B%	20-21% (n=2)
	피크 E+F%	10-11% (n=2)
크기 배제 HPLC		99.9-99.9% (n=5)
세포 흡수율 (바이오검정)		85, 95% 및 97% (n=3)
포르밀글리신%		87-95% (n=5)
특이적 활성		62-78 (n=5)
글리칸 맵	Pk Grp 3	88-93% (n=5)
	Pk Grp 5	72-110% (n=5)
	Pk Grp 6	124-133% (n=5)
	Pk Grp 7	78-87% (n=5)
	총 면적	94-116% (n=5)
시알산		16-22 (n=4)
내독소		<0.04-<0.05 (n=2)
바이오버든		0.00-0.00 (n=2)

[0180]

[0181] 시판되는 I2S 참조에 비해 예시적인 펩타이드 맵을 도 2에 도시한다. 예시적 SDS-PAGE (Silver) 분석 결과를 도 3에 도시한다. 전형적으로, 본원에 기재된 공정 이용시, 약제 물질(drug substance)(DS)의 HCP 농도는 US를 포함하는 많은 시장에서 요구되는 <100 ppm 사양을 충족시키는 <100 ppm이었다. DS의 SEC는 ≥99.5%였는데, 이것 역시 많은 시장에서의 현행 >99.3% 마케팅 사양 요건을 충족한다. 예시적 전하 프로파일을 도 4에 도시한다. 예시적 글리칸 맵을 도 5에 도시한다. 특히, 정제된 I2S의 글리칸 맵은 시알산 및 만노오스-6-포스페이트 잔기로부터 유래된 음전하의 증가량에 따라 용출되며, 용출 순서대로 중성, 모노-시알릴레이티드, 디시알릴레이티드, 모노포스포릴레이티드, 트리시알릴레이티드 및 하이브리드 (모노시알릴레이티드 및 캡핑된 M6P), 테트라시알릴레이티드 및 하이브리드 (디시알릴레이티드 및 캡핑된 M6P) 및 디포스포릴레이티드 글리칸을 나타내는 7개의 피크 그룹을 포함한다.

[0182] 이들 모두를 고려할 때, 이러한 실시예는 단순화된 네 개의 컬럼 정제 공정을 이용하여 동물성분 비함유 배지에서 생산된 재조합 I2S를 대규모로 성공적으로 정제할수 있음을 입증한다.

[0183] **실시예 2: 재조합 I2S AF의 수득 및 바이러스 비활성화 안정성 연구**

[0184] 본 연구의 목적은 재조합 I2S 정화 수득물의 안정성에 미치는 온도 유지 시간 및 동결-해동 주기의 효과를 평가하는 것이었다.

[0185] 정화된 수득 샘플을 주위 및 2-8℃에서 7일 이하로 저장하고, 바이러스 비활성화된 UPB 샘플을 주위에서 24시간 이내로 유지시켰다. 정화된 수득물에 대한 동결-해동 샘플을 -20℃, -50℃, 및 -80℃에서 동결시키고, 3회 이하의 주기로 동결-해동을 겪게 하였다. 웨스턴 블롯, SEC HPLC, 및 활성 검정을 이용하여 안정성을 측정하였다.

[0186] I2S-AF 수득물을 2D 세포주로부터 CCPD에 의해 원심분리 체류 장치 및 요망되는 블리딩(bleeding) 속도를 갖는

B. Braun 20L 배양기를 이용하여 생산하였다. 온도 유지 연구를 위해, 각각의 정화된 수득물을 주위 및 2-8℃에 저장하고 선택된 유지 시간에 샘플링하였다. 샘플링의 양 및 유지 시간을 표 5에 나열한다. 동결-해동 샘플을 -20℃, -50℃, 및 -80℃에 유지하고 수조를 이용하여 25℃에서 해동시켰다.

[0187] **표 5. 정화된 수득물 유지점(hold point) 안정성**

[0188]

	샘플	유지 온도	유지 시간 (일수)
정화된 수득물 12	15 x 0.5 mL	2-8 ℃	T=0, 24h, 76h, 120h, 168h
	15 x 0.5 mL	주위	T=0, 24h, 76h, 120h, 168h
	9 x 0.5 mL	-20 ℃, -50 ℃, 및 -80 ℃	동결/해동 1, 2, 및 3
정화된 수득물 18	15 x 0.5 mL	2-8 ℃	T=0, 24h, 76h, 120h, 168h
	15 x 0.5 mL	주위	T=0, 24h, 76h, 120h, 168h
	9 x 0.5 mL	-20 ℃, -50 ℃, 및 -80 ℃	동결/해동 1, 2, 및 3

[0189] 바이러스 비활성화 단계는 첫 번째 컬럼을 로딩하기 전에 정제되지 않은 벌크 단계에서 수행했다. 정화된 수득물의 농축 및 완충제 교환에 의해 UPB를 수행하였다. UF/DF를 Pall 1 sq. ft을 이용하여 수행하였다. 농축 시스템 및 완충제를 10 mM MES, 155 mM NaCl, pH=6.5로 교환하였다. 바이러스 비활성화 단계에 1% Tween 80 및 0.3% TnBP를 첨가하고 각 시점에 Durapore 주사기 필터를 이용하여 여과하였다. 샘플을 표 6에 나열된 각 시점에 취하여 -80℃에서 동결시켰다. 정화된 수득물 유지점 및 동결-해동 연구에서의 샘플을 웨스턴 블롯 및 활성(4-MU 검정)에 의해 시험하였다. 바이러스 비활성화한 UPB 샘플을 SEC HPLC에 의해 순도를시험하였다. 표 5에서 수득물 12 및 18로부터의 유지점 활성 결과는 두 개의 수득물 모두가 주위 및 2-8℃에서 7일 이내의 저장 동안 아무런 유의한 변화가 없었음을 나타내었다. -20℃, -50℃, 및 -80℃에서 3회 이하의 동결-해동 주기 동안 저장된 수득물 12의 활성에서도 아무런 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0190] **표 6. 정제되지 않은 벌크의 바이러스 비활성화**

[0191]

	샘플	유지 온도	유지 시간 (일수)
바이러스 비활성화	9 x 0.5 mL	주위, 대조군	T=0, 6h, 24h
	9 x 0.5 mL	주위, 바이러스 비활성화	T=0, 6h, 24h

[0192] 바이러스 비활성화 UPB 단계의 안정성에 대한 활성 및 SEC-HPLC을 도 6 및 7에 기재한다. 이것은 24시간 이내에 활성 및 순도에 기반한 바이러스 비활성화 안정성에 있어서 아무런 문제도 없었음을 나타낸다.

[0193] 요약하면, 본원에 기재된 안정성 분석에 기반하여, 정화된 수득물은 2-8℃에서 (예를 들어, 7일 이내) 수득물 품질의 유의한 변화없이 저장될 수 있다. 정화된 수득물은 여러 번의 동결-해동 주기를 겪을 수 있고 안정성에서의 유의한 변화없이 -20℃, -50℃, 및 -80℃에서 저장될 수 있다. SEC HPLC 순도 결과에 기반하여, UPB 단계에서의 바이러스 비활성화가 활성 및 순도에서의 변화없이 주위 온도 (예컨대, 24시간 이내)에서 일어날 수 있다.

[0194] **실시예 3: 동물성분 비함유 IL CD 배지 정제 및 분석의 확인 수행**

[0195] 본 연구의 목적은 화학적으로 규정된 배지를 이용하여 동물성분 비함유 관류로 생산된 I2S-AF의 풀링된 수득물로부터 정제를 수행하고 약제 물질를 특성화하는 것이었다.

[0196] 본 연구는 I2S-AF 정제 공정 성능 및 화학적으로 규정된 배지 생물 반응기로부터 생산된 약제 물질 (DS)를 평가하였다.

[0197] *세포 배양*

[0198] I2S-AF 물질을 실시예 1에 기재된 2S 및 포르밀글리신 생성 효소 (FGE)를 발현하는 세포주2D로부터 제조하였다. 상기 물질을 1L Das Gip 스핀 필터 배양기에서 화학적으로 규정된 무혈청 배지를 이용하여 CCPD에서

생산하였다. 각각의 정화된 수득물의 개별 백(bag) (HI-21)을 -20℃에서 동결된 채로 받아서 2-8℃에서 밤새 해동시켰다. 동일한 부피의 각각의 정화된 수득물을 풀링시켜 전체 수득물 풀을 나타낸 다음, 0.2㎛ 여과시키고, 1 ft^2의 총 막면적을 갖는 30 kD Pall 오메타 센트라메이트 카세트 (Omega Centramate Cassette)를 이용하여 농축시켰다. 정제되지 않은 벌크 (UPB)를 0.2㎛ 여과시키고, 사용 전에 동결시켰다.

[0199] *정제*

[0200] 예시적 컬럼 사양 및 로딩을 표 7에 기재한다. 역가에 의해 3 g/L의 표적을 Q 세파로스에 로딩시켰다. 후속하여 컬럼에 이전 컬럼 용출액의 100%를 로딩시켰고 어떠한 물질도 제거하지 않았다.

[0201] **표 7. 컬럼 및 로딩 사양**

[0202]

컬럼	컬럼 치수 (cm x cm)	컬럼 부피 (mL)	컬럼 로드 (I2S g/수지 L)	컬럼 로드 (mg)
Q 세파로스	2.6 x 25	133	3	399
HA 타입 II, 80 μm	1.6 x 30	60	5.5	330
페닐 세파로스	1.6 x 23	46	5.6	258

[0203] 생물 반응기로부터의 풀링 수득물 1 내지 21로부터의 UPB를 이용하여 1회의 정제 런을 수행하였다. UPB를 2-8℃에서 밤새 해동시키고, 각각의 수득물로부터의 동일한 부피에 의해 풀링시켰다.

[0204] 개별적인 컬럼 공정 단계 및 완충제 제형을 표 8-11에서 기재하였다. 풀링된 UPB를 0.2 ㎛ 병 필터 시스템 (bottle filter system)을 이용하여 여과하고, 1 M 소듐 아세테이트를 이용하여 pH 6.5로 조정하고, Q 세파로스 FF 컬럼 상에 로딩시키기 전에 5 M 염화나트륨를 이용하여 전도도를 16 mS/cm로 조정하였다. Q 세파로스 용출액을 0.25M $NaPO_4$, pH 5.5를 이용하여 0.001 M $NaPO_4$로 조정하고, HA 컬럼 상에 로딩시키기 전에 0.22 ㎛ PES 병 상부 필터(bottle top filter)로 여과시켰다. HA 용출액 전도도를 5 M NaCl을 이용하여 1.55 M NaCl로 조정하고 pH를 1 M 소듐 아세테이트를 이용하여 pH 5.5로 조정하였다. 조정 시간은 약 1 시간이었다. 조정된 풀을 페닐 세파로스 컬럼 상에 로딩시키기 전에 0.22 ㎛ PES 병 상부 필터를 이용하여 여과시켰다. 페닐 용출액을 4회 농축시키고 0.02 M $NaPO_4$, 0.137 M NaCl, pH 6.0으로 6회 정용여과하였다. 정용여과된 생성물을 2.0 g/L로 조정하고 모의 약제 물질를 생성하기 위해 0.2% 폴리소르베이트 20과 함께 제형화시켰다. DS의 H1-20의 모의 풀을 추가 특성화를 위해 생성하였다.

[0205] **표 8. Q 세파로스 FF 크로마토그래피의 예시적인 공정 상세설명**

[0206]

공정 단계	유속 (cm/hr)	CV	완충제
위생화	150	3	0.5 N NaOH
평형화	150	4	0.01 M MES, 0.155 M NaCl, ph 6.5
세척 1	150	2	0.01 M MES, 0.155 M NaCl, ph 6.5
세척 2	150	3	0.01 M MES, 0.155 M NaCl, ph 5.5
용출	150	3	0.01 M MES, 0.50 M NaCl, ph 5.5
세정/스트립	150	4	1.0 M NaOH, 2 M NaCl
저장	150	4	0.0 N NaOH

[0207] 표 9. HA 크로마토그래피의 예시적인 공정 상세설명

공정 단계	유속 (cm/hr)	CV	완충제
위생화	200	3	0.5 N NaOH
충전	200	3	0.250 M $NaPO_4$, pH 5.5
평형화	200	3-6	0.01M MES, 0.001M $NaPO_4$, 0.5M NaCl, pH 5.5
세척 1	200	1	0.01M MES, 0.001M $NaPO_4$, 0.5M NaCl, pH 5.5
세척 2	200	6	0.01M MES, 0.01M $NaPO_4$, 0.5M NaCl, pH 5.5
용출	200	3	0.01M MES, 0.08M $NaPO_4$, pH 5.5
스트립	200	4	0.4M $NaPO_4$ pH 12
세정	200	4	0.5 N NaOH
저장	200	4	0.1 N NaOH

[0208]

[0209] 표 10. 페닐 세파로스 크로마토그래피에 대한 예시적인 공정 상세설명

공정 단계	유속 (cm/hr)	CV	완충제
위생화	150	3	0.5 N NaOH
평형화	150	4-6	0.02 M MES, 1.5 M NaCl, pH 5.5
세척	150	2	0.02 M MES, 1.5 M NaCl, pH 5.5
용출	150	3	0.02 M MES, 0.2 M NaCl, pH 5.5
물 세척	150	3	RO/DI 물
에탄올 세척	150	3	20% 에탄올
세정	150	3	0.5 N NaOH
저장	150	3	0.01 N NaOH

[0210]

[0211] 표 11. 페닐 용출 풀의 예시적인 정용여과

여과 유닛	Centricon Plus 70
다이아필트레이션 완충제	0.02 M $NaPO_4$, 0.137 M NaCl, pH 6.0
다이아필트레이션 부피	6X-8X

[0212]

[0213] *ELISA에 의한 HCP에 의한 인 프로세스(In Process) 순도*

[0214] 표 12는 각각의 단계에 대한 인-프로세스 HOP 제거를 기재한다. 인-프로세스 HCP 결과는 HA 단계에서 대부분의 제거를 나타내며 높았다.

[0215] 표 12. 인-프로세스 HCP 제거

단계	HCP (ng/mg)	LRV	HCP 배수
Q	46,392 51,957	0.3	2
HA	51,957 5,876	1.3	18
페닐	5,876 1,870	0.7	5

[0216]

[0217] 약제 물질 *특성화*

[0218] 예시적 약제 물질 로트 방출 결과를 표 13에 나열한다. 보이는 바와 같이, 약제 물질는 정제된 재료에서 높은 특이적 활성 및 %FG를 가졌다. 예시적 약물 속성 특성화를 표 13에 도시한다. 최종 UF/DF 단계에서 HCP가 1,870 ng/mg에서 372 ng/mg으로 감소하였다.

[0219] 표 13. 예시적 약제 물질 로트 방출(lot release)

DS 로트 방출	1L CD 배지 (I2S-AF)
%FG	94%
글리칸 맵	
그룹 3	99%
그룹 5	89%
그룹 6	104%
그룹 7 (2-M6P)	95%
총 면적	107%
시알산	17
내재화	83%
SEC-HPLC	99.9%
특이적 활성 (U/mg)	82
IEX HPLC	
A (%)	64%
B (%)	23%
A+B	87%
E+F	0%
숙주 세포 단백질	372
세포 흡수율	98

[0220]

[0221] 실시예 4. 정제된 재조합 I2S 효소의 물리 화학적 및 생물학적 특성화

[0222] 본 실시예의 목적은 상기 기재된 방법을 이용하여 정제된 재조합 I2S 단백질의 상세한 특성화를 수행하는 것이었다.

[0223] *SDS-PAGE*

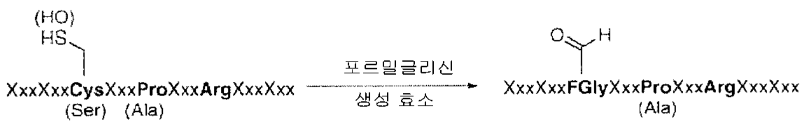
[0224] 실험을 위해, 두 개의 분리된 무혈청 세포 배양반응으로 2D 및 4D 인간 세포주를 이용하여 재조합 I2S 단백질을 생성하였다. 상기 기재된 방법을 이용하여 샘플을 수집하고 정제시켰다. 정제된 I2S 효소를 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 가시화를 위해 은 염색으로 처리하였다. 예시적 결과를 도 8에 도시한다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 본원에 기재된 방법을 이용하여 정제된 재조합 I2S 단백질은 표준 방법을 이용하여 정제된 I2S 참조 샘플과 유사한 밴딩 패턴을 나타낸다.

[0225] *펩타이드 맵*

[0226] I2S-AF 2D 세포주에 의해 생산된 재조합 I2S 단백질을 상기 기재된 방법을 이용하여 정제시켰다. 정제된 재조합 I2S 및 참조 인간 I2S의 샘플을 각각 단백질분해시키고, HPLC 분석에 의해 조사하였다. 참조 I2S와 비교한 예시적 펩타이드 맵을 도 9에 도시한다.

[0227] *포르밀글리신 전환 퍼센트*

[0228] 펩타이드 맵핑을 이용하여 FGly 전환 퍼센트를 측정하였다. I2S 활성화는 하기 도시된 바와 같이 포르밀글리신 생성 효소 (FGE)에 의한 시스테인 (성숙 인간 I2S의 59번 위치에 상응함)의 포르밀글리신으로의 전환을 필요로 한다:



[0229]

[0230] 따라서, 포르밀글리신 전환율 (%FG)은 하기 식을 이용하여 계산될 수 있다:

$$\%FG\ (\text{of DS}) = \frac{\text{활성 I2S 분자의 수}}{(\text{활성} + \text{비활성})\ \text{I2S 분자의 총수}} \times 100$$

[0231]

[0232] 예를 들어, 50% FG는 정제된 재조합 I2S의 반이 어떠한 치료적 효과 없이 효소적으로 비활성인 것을 의미한다.

[0233] 펩타이드 맵핑을 이용하여 %FG를 계산하였다. 간략하게, 정제된 재조합 I2S 단백질을 프로테아제 (예컨대, 트립신 또는 키모트립신)를 이용하여 짧은 펩타이드로 분해시켰다. 짧은 펩타이드를 분리시키고, HPLC를 이용하여 특성화하였다. 성숙 인간 I2S의 59번 위치에 상응하는 위치를 함유하는 펩타이드는 59번 위치의 Cys가 대조군 (예컨대, FGly 전환이 없는 I2S 단백질 또는 100% FGly 전환된 I2S 단백질)과 비교하여 FGly로 전환되었는지를 결정하였다. FGly를 함유하는 펩타이드의 양 (활성 I2S 분자의 수에 상응함) 및 FGly와 Cys 둘 모두를 갖는 펩타이드의 총 양 (총 I2S 분자의 수에 상응함)을 상응하는 피크 면적에 기반하여 측정할 수 있으며, %FG를 반영하는 비율을 계산하였다. 예시적 결과를 표 14에 도시한다.

[0234] *글리칸 맵-만노스-6-포스페이트 및 시알산 함량*

[0235] 정제된 재조합 I2S 단백질의 글리칸 및 시알산 조성을 결정하였다. 글리칸 맵을 생성하는 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 글리칸 조성물의 정량을 수행하였다. 하기 기재된 대로, 본원에 기재된 조건하에 정제된 재조합 I2S의 글리칸 맵은 효소적 분해로부터 초래된 시알산 및 만노스-6-포스페이트 당형태로부터 적어도 부분적으로 유래된 음전하의 증가량에 따라 용출되는 7개의 피크 그룹으로 구성된다. 간략하게, 무혈청 세포 배양 (I2S-AF 2D 무혈청 및 I2S-AF 4D 무혈청)으로부터의 정제된 재조합 I2S 및 참조 재조합 I2S를, 시알산 잔기의 제거를 위해 (1) 정제된 뉴라미니다제 효소 (아르트로박터 우레아파시엔스(*Arthrobacter Ureafaciens*)로부터 분리된 (10 mU/μL), Roche Biochemical (Indianapolis, IN), Cat. # 269 611 (1U/100μL)), (2) 만노스-6-포스페이트 잔기의 완전한 제거를 위해 2시간 동안 37±1에서 알칼린 포스파타제, (3) 알칼린 포스파타제 + 뉴라미니다제 중 어느 하나로 처리하거나, (4) 처리하지 않았다. 각각의 효소적 분해물을 Dionex CarboPac PA1 Guard 컬럼이 장착된 CarboPac PA1 분석 컬럼을 이용하여 펄스형 암페로메트리 검출법(HPAE-PAD)과 함께 고성능 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분석하였다. 0.4 내지 2.0 nmole 범위의 일련의 시알산 및 만노스-6-포스페이트 표준을 각각의 검정을 위해 진행시켰다. 100 mM 수산화나트륨에서 48 mM 소듐 아세테이트를 이용한 동용매 방법을 최소 15분간 1.0 mL/분의 유속으로 주위 컬럼 온도에서 진행시켜 각각의 피크를 용출시켰다. I2S-AF 및 참조 I2S 샘플 둘 모두에 대해, 각각의 개별적인 런으로부터 생성된 데이터를 단일 크로마토그래피로 각각 조합시켜 각각의 개별적인 재조합 단백질에 대한 글리칸 맵을 나타내었다. 도 10에 나타낸 대로, 무혈청 배지로부터 정제된 I2S에 대한 글리칸 맵은 중성, 모노-시알릴레이티드, 디시알릴레이티드, 모노포스포릴레이티드, 트리시알릴레이티드 및 하이브리드 (모노시알릴레이티드 및 캡핑된 만노스-6-포스페이트) 및 디포스포릴레이티드 글리칸을 구성하는 대표적인 용출 피크 (용출 순서대로)를 나타내었다. 예시적 글리캅 맵을 도 10에 도시한다.

[0236] 각각의 재조합 I2S 샘플 중 평균 시알산 함량 (단백질 1몰에 대한 시알산의 몰)을 시알산 표준의 선형 회귀 분석으로부터 계산하였다. PeakNet 6 소프트웨어를 이용하여 각각의 크로마토그램 수행을 가시화하였다. 시알산 표준 및 재조합 I2S 검정 대조군과 시험 샘플로부터 방출된 시알산이 단일 피크로 보인다. I2S에 대한 시알산의 양 (nmole)을 하기 방정식을 이용하여 원시 값(raw value)으로서 계산하였다:

$$S.A.(I2S\text{몰에 대한 몰}) = \frac{(\text{시알산}\ nmole)}{(0.3272)(C)}$$

[0237]

[0238] 상기에서, C는 샘플 또는 재조합 I2S 검정 대조군의 단백질 농도 (mg/ml)이다.

[0239] 각각의 시험 샘플에 대해 하기 식을 이용하여 단백질 1몰에 대한 시알산의 몰로서 시알산의 교정값을 계산하였다:

$$\text{교정된}\ S.A. = \frac{(\text{샘플 원시 시알산 값})x(\text{확립된 이듀르설파제 검정 대조군 값})}{(\text{이듀르설파제 검정 대조군 원시 시알산 값})}$$

[0240]

[0241] I2S-AF 2D 또는 4D 세포주로부터 정제된 재조합 I2S에 대한 시알산 함량을 나타내는 예시적 데이터를 표 14에

도시한다.

[0242] 표 14: 무혈청 세포 배양액으로부터 정제된 I2S의 예시적인 특성

검정	I2S-AF 2D (무혈청)
펩타이드 맵핑	
L1	101
L10	100
L12	102
L13	97
L14	101
L17	100
L20	102
숙주 세포 단백질	< 62.5 ng/mg
이온 교환 HPLC 면적 %	
피크 A	62
피크 A+B	82
피크 E+F	0
포르밀글리신 %	87
특이적 활성 (U/mg) (설페이트 방출 검정)	64
% 크기 배제 HPLC	≥99.8 (n=13)
글리칸 맵핑	
모노시알릴레이티드	105
디시알릴레이티드	93
모노포스포릴레이티드	139
트리시알릴레이티드	89
테트라시알릴레이티드	125
디포스포릴레이티드	95
시알산 (mol/mol)	20

[0243]

[0244] *특이적 활성*

[0245] 본원에 기재된 방법을 이용하여 정제된 재조합 I2S 효소의 특이적 활성을 *시험관내* 설페이트 방출 검정 또는 4-MUF 검정을 이용하여 분석하였다.

[0246] *시험관내* 설페이트 방출 검정

[0247] 헤파린 디사카라이드를 기질로서 이용하여 *시험관내* 설페이트 방출 활성 검정을 수행하였다. 특히, 이러한 검정은 천연 유래된 기질인 헤파린 디사카라이드로부터 설페이트 이온을 방출시키는 I2S의 성능을 측정하는 것이다. 방출된 설페이트를 전도도 검출기가 장착된 이온 크로마토그래피에 의해 정량할 수 있다. 간략하게, 샘플을 먼저 10 mM Na 아세테이트, pH 6으로 완충제 교환시켜 제형 완충제 중 포스페이트 이온에 의한 억제를 제한하였다. 그 후, 샘플을 반응 완충제 (10 mM Na 아세테이트, pH 4.4)를 이용하여 0.075 mg/ml로 희석시키고, 30 μL의 반응 부피에서 0.3 ㎍ I2S/100 ㎍ 기질의 효소 대 기질 비로 헤파린 디사카라이드와 함께 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 샘플을 100℃에서 3분간 가열시켜 반응을 중단시켰다. IonPac AG18 guard 컬럼이 구비된 Dionex IonPac AS18 분석 컬럼을 이용하여 분석을 수행하였다. 1.0 mL/분의 30 mM 수산화칼륨를 이용하여 15분간 동용매 방법을 이용하였다. I2S 샘플에 의해 방출된 설페이트의 양을 1.7 내지 16.0 nmole 범위의 설페이트 표준의 선형 회귀 분석으로부터 계산하였다. 기록가능한 값을 단백질 1mg에 대한 유닛으로 표시하였고, 여기서 1 유닛은 시간 당 방출된 1 μmole의 설페이트로서 정의되며 단백질 농도는 A280 측정으로 결정하였다. 예시적 결과를 표 14에 도시한다.

[0248] 4-MUF 검정

[0249] 정제된 재조합 I2S 효소의 특이적 활성은 또한 형광성 기반 4-MUF 검정을 이용하여 분석할 수 있다. 간략하게, 검정은 I2S 기질인 4-메틸움벨리페릴-설페이트 (4-MUF-SO_4)의 가수분해를 측정하는 것이다. I2S에 의한 4-MUF-SO_4 기질의 절단시에, 분자는 설페이트 및 천연 형광 4-메틸움벨리페론 (4-MUF)으로 전환된다. 결과적으로, 시

간 경과에 따른 형광 신호에서의 전체적인 변화를 평가함에 의해 I2S 효소 활성을 측정할 수 있다. 이러한 실험을 위해, 정제된 I2S 효소를 4-메틸움벨리페릴-설페이트 (4-MUF-SO_4), 포타슘 염 (Sigma Cat. # M-7133)의 용액과 함께 인큐베이션하였다. 일련의 대조군 참조 샘플을 이용하고, 원액의 1:100, 1:200 및 1:20,000으로 희석된 시판되는 I2S 효소를 이용하여 검정의 교정을 수행하였다. 효소적 검정을 37℃에서 진행시키고 교정된 형광측정기를 이용하여 검정하였다. 각각의 참조 표준에 대해 수득된 형광값을 이용하여, 편차 계수 퍼센트를 하기 방정식을 이용하여 결정하였다:

[0250]

$$\%CV = \frac{\text{원시 형광값의 표준 편차 } (N=3)}{\text{평균 형광값}} X100\%$$

[0251] 그 후, CV 퍼센트 값을 이용하여 각각의 샘플에 대한 교정된 평균 형광성을 계산함으로써, 하기 방정식을 이용하여 mU/mL로서 표시된, 기록가능한 효소 활성을 결정하였다:

[0252]

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

[0253] CFU = 네거티브 교정된 평균 형광성

[0254] DF - 희석률

[0255] 1 밀리유닛의 활성은 37℃에서 1분 동안 1 나노몰의 4-메틸움벨리페릴-설페이트를 4-메틸움벨리페론으로 전환시키는데 필요한 효소의 양이다.

[0256] *전하 프로파일*

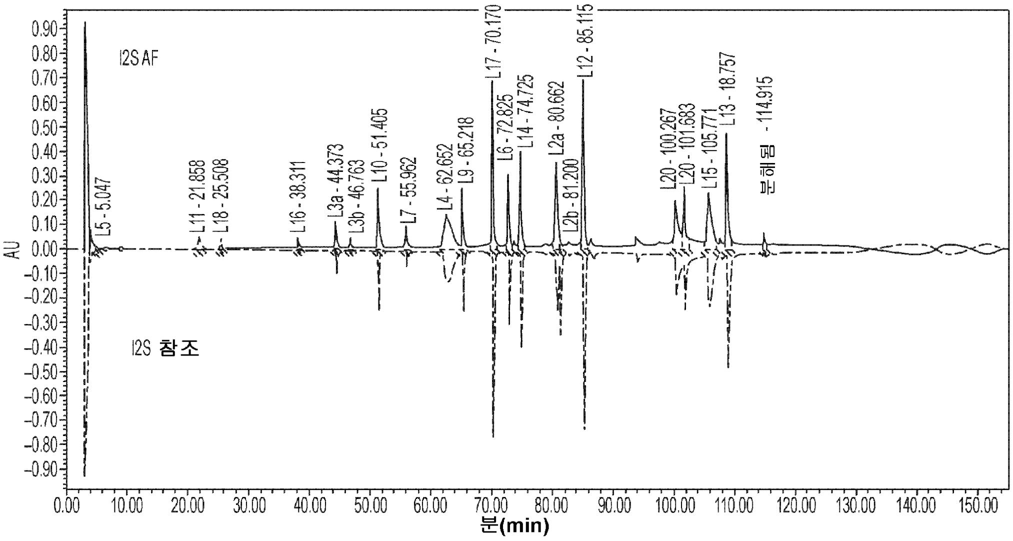
[0257] *상기 실험을 위해, 각각의 정제된 재조합 I2S의 전하 분포를 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템과 함께, 강한 음이온 교환 (SAX) 크로마토그래피로 측정하였다. 상기 방법은 표면 전하 차이에 기반하여, 샘플내에서 재조합 I2S 변이체를 분리시킨다. pH 8.00에서, 음으로 하전된 종들은 SAX 컬럼에 고정된 양전하 상에 흡착한다. 증가하는 이온 강도의 구배를 이용하여 컬럼과의 이온성 상호작용의 강도에 비례하여 각각의 단백질 종들을 용출시킨다. 무혈청 성장 조건하에 2D 세포주로부터 분리된, 100 마이크로그램의 정제된 I2S 또는 참조 재조합 I2S 효소를 주위 온도로 유지된 Amersham Biosciences Mini Q PE (4.6 x 50 mm) 컬럼 상에 로딩시키고 20 mM Tris-HCl, pH 8.00로 평형화시켰다. 20 mM Tris-HCl, 1.0 M 염화나트륨, pH 8.00의 이동상을 이용하여 0.80 mL/분의 유속으로 구배 용출시켰다. 샘플 용출액의 흡광도를 280 nm 파장에서 측정하므로써, 주행 동안에 단백질 농도를 계속하여 측정하였다. 2D 및 4D 세포주로부터 정제된 재조합 I2S에 대해 관찰된 전하 프로파일을 나타내는 예시적인 결과를 도 11에 도시한다.*

도면

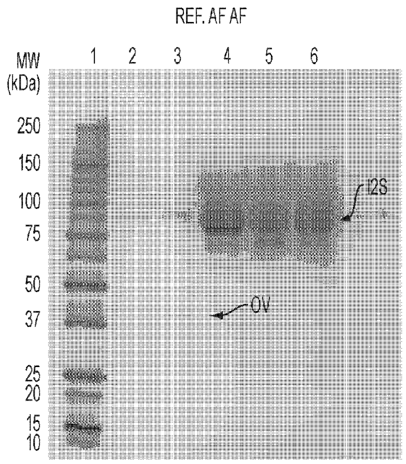
도면1

해동 UPB, 2-8 °C,
깊이 여과
바이러스 비활성화
1% 폴리소르베이트 80, 0.3 % TnBP
이온 교환 크로마토그래피
Q SEPHAROSE/Q CAPTO
80 cm
수산화 아파타이트 타입 II
크로마토그래피
60 cm
이온 교환 크로마트그래피
SP 세파로오스 FF
60 cm
페닐 세파로오스 FF
크로마토그래피
60 cm
바이러스 여과
플라노바(planova)
제형 버퍼 내로의 UF/DF 첨가
(2mg/ml)
20 mM 수산화칼륨
137 mM NaCl, pH 6.0
0.2 미세 여과
약제 물질

도면2

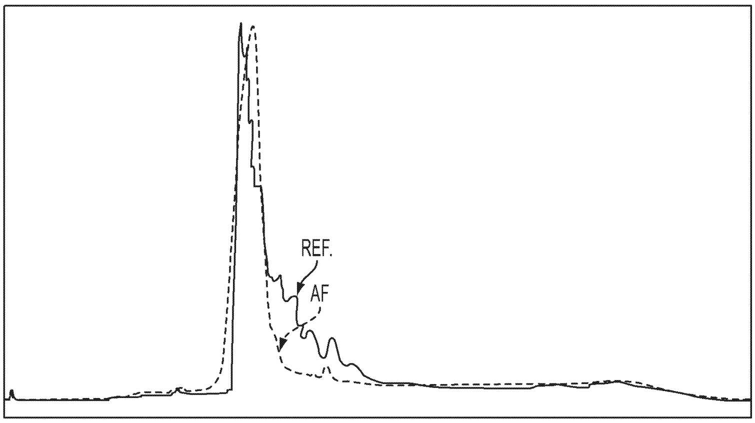


도면3

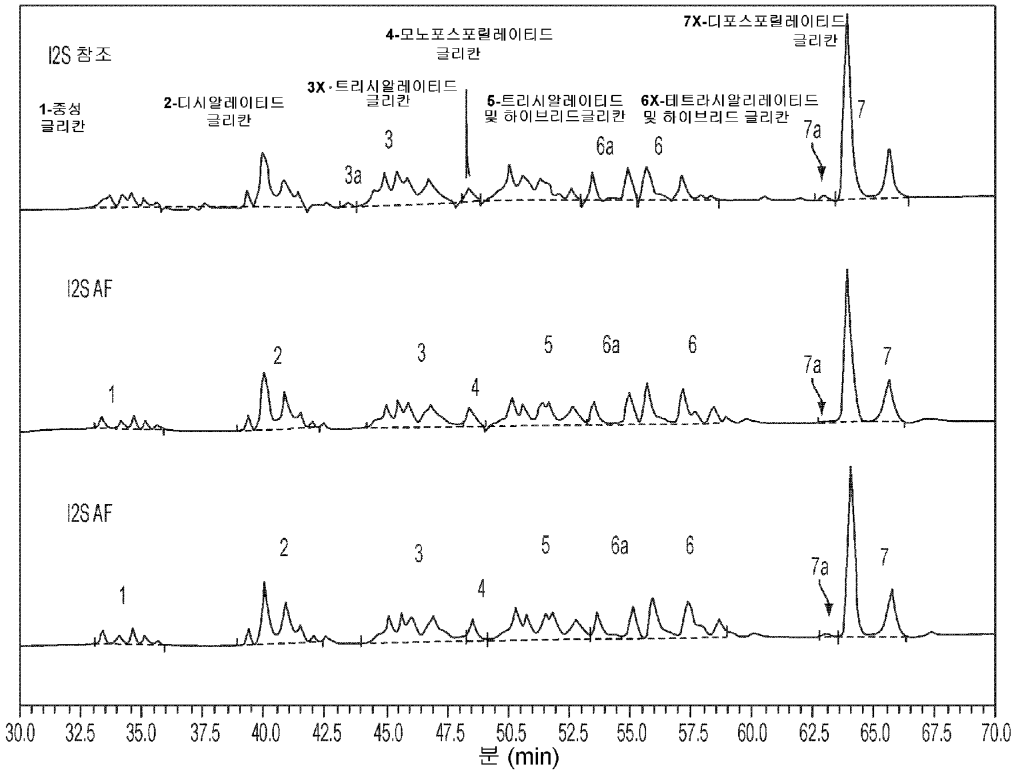


레인	로딩 샘플	패드 ID	로딩 용적	총량 ㎍
1	단백질 및 **STDS**의 정밀도(염색되지 않음)		3㎕	
2	어세이 대조군 #1		20	8㎍ EACH, OV END REF
3	어세이 대조군 #2		20	18㎍ EACH, OV END REF
4	참조 규준		20	8
5	RDSF 11-101 MOCK DS	11AD0545-1	20	8
6	RDSF 11-105 MOCK DS	11AD0545-2	20	8

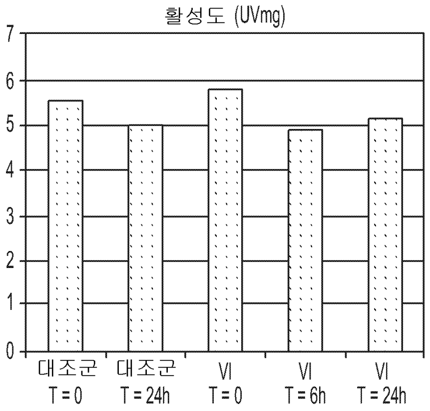
도면4



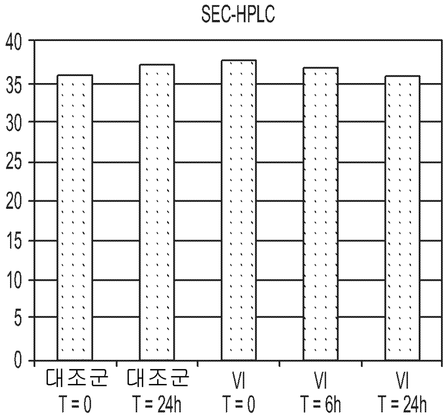
도면5


I2S 참조
1-중성 글리칸
2-디시알레이티드 글리칸
3X·트리시알레이티드 글리칸
4-모노포스포릴레이티드 글리칸
5-트리시알레이티드 및 하이브리드글리칸
6X-테트라시알리레이티드 및 하이브리드 글리칸
7X-디포스포릴레이티드 글리칸
3a
3
6a
6
7a
7
I2S AF
1
2
3
4
5
6a
6
7a
7
I2S AF
1
2
3
4
5
6a
6
7a
7
30.0 32.5 35.0 37.5 40.0 42.5 45.0 47.5 50.5 52.5 55.0 57.5 60.0 62.5 65.0 67.5 70.0
분 (min)

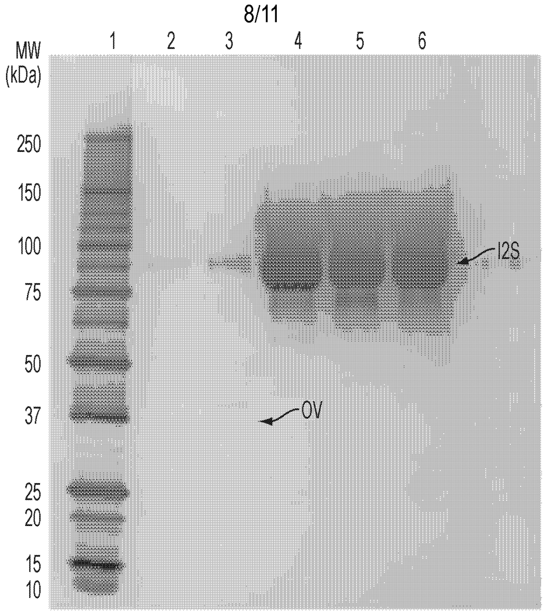
도면6


활성도 (UVmg)
7
6
5
4
3
2
1
0
대조군 T = 0
대조군 T = 24h
VI T = 0
VI T = 6h
VI T = 24h

도면7

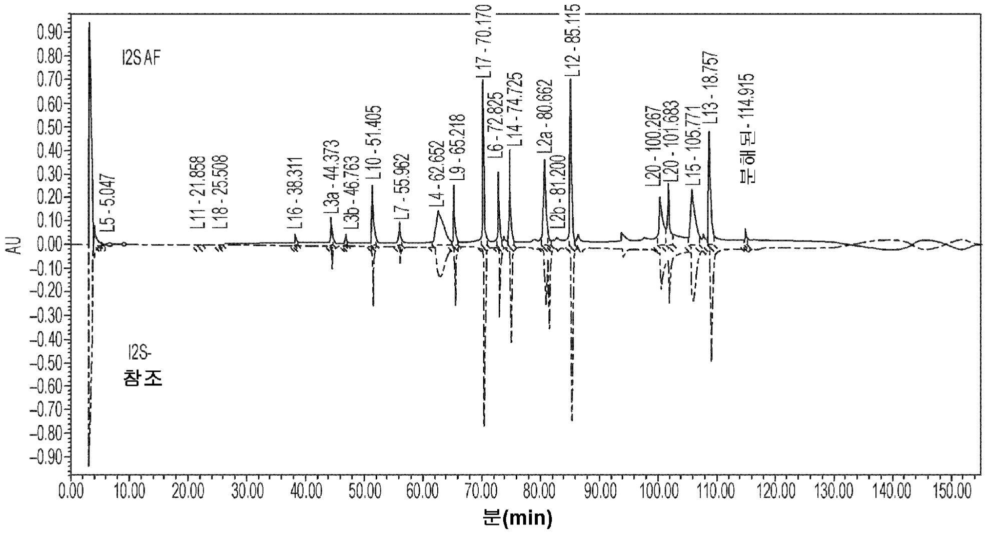


도면8

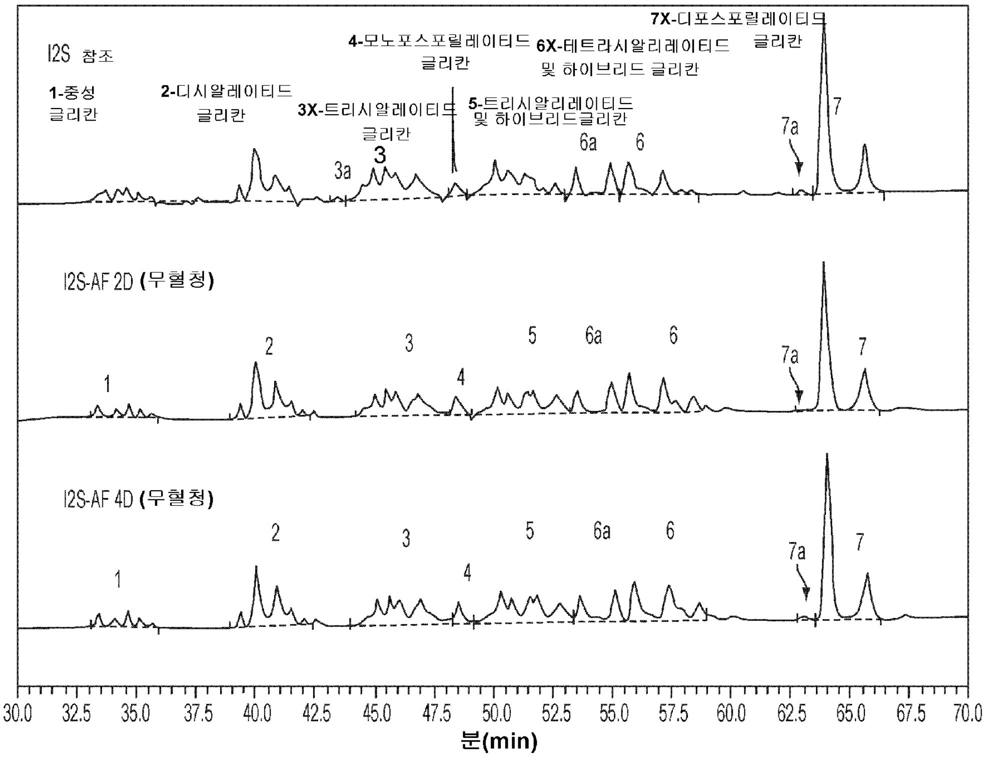


레인	로딩 샘플	로딩 용적	총량 ㎍
1	단백질 **STDS**	3 µl	
2	어세이 대조군 **#1**	20 µl	8 µg
3	어세이 대조군 **#2**	20 µl	16 µg
4	**I2S**참조 표준	20 µl	8 µg
5	I2S-AF 2D 무혈청 배양액	20 µl	8 µg
6	I2S-AF 4D 무혈청 배양액	20 µl	8 µg

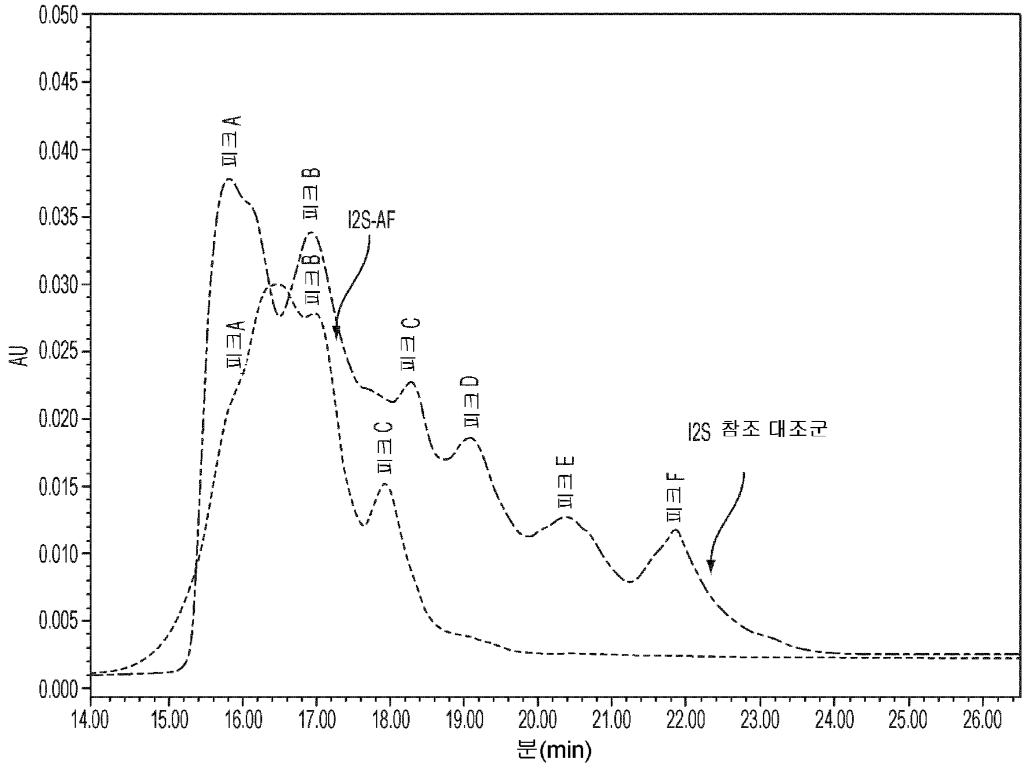
도면9


I2S AF
I2S-
참조
AU
L5 - 5.047
L11 - 21.858
L18 - 25.508
L16 - 38.311
L3a - 44.373
L3b - 46.763
L10 - 51.405
L7 - 55.962
L4 - 62.652
L9 - 65.218
L17 - 70.170
L6 - 72.825
L14 - 74.725
L2a - 80.662
L2b - 81.200
L12 - 85.115
L20 - 100.267
L20 - 101.683
L15 - 105.771
L13 - 18.757
분해된 - 114.915
0.90 0.80 0.70 0.60 0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00 -0.10 -0.20 -0.30 -0.40 -0.50 -0.60 -0.70 -0.80 -0.90
0.00 10.00 20.00 30.00 40.00 50.00 60.00 70.00 80.00 90.00 100.00 110.00 120.00 130.00 140.00 150.00
분(min)

도면10


I2S 참조
1-중성 글리칸
2-디시알레이티드 글리칸
3X-트리시알레이티드 글리칸
4-모노포스포릴레이티드 글리칸
5-트리시알리레이티드 및 하이브리드글리칸
6X-테트라시알리레이티드 및 하이브리드 글리칸
7X-디포스포릴레이티드 글리칸
3a
3
6a
6
7a
7
I2S-AF 2D (무혈청)
I2S-AF 4D (무혈청)
1
2
3
4
5
30.0 32.5 35.0 37.5 40.0 42.5 45.0 47.5 50.0 52.5 55.0 57.5 60.0 62.5 65.0 67.5 70.0
분(min)

도면11



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부