



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035369

(51)⁷ C12N 9/16; A61K 38/46; C07K 16/00; (13) B
A61K 38/17; C07K 1/00

(21) 1-2015-00308

(22) 28/06/2013

(86) PCT/US2013/048561 28/06/2013

(87) WO 2014/005014 03/01/2014

(30) 61/666,733 29/06/2012 US

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/06/2015 327A

(73) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)

300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA

(72) NICHOLS, Dave (US).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP ĐÃ TINH CHẾ

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp đã tinh chế. Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, phương pháp cải tiến để tinh chế I2S protein được tạo ra theo kỹ thuật tái tổ hợp cho liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế. Sáng chế, một phần, dựa trên một khám phá bất ngờ là protein I2S tái tổ hợp có thể được tinh chế từ các nguyên liệu sinh học chưa được xử lý, như môi trường nuôi cấy tế bào chứa I2S, bằng cách áp dụng quy trình bao gồm ít đến bốn cột sắc ký.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp cải tiến để tinh chế I2S protein được tạo ra theo kỹ thuật tái tổ hợp cho liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp đã tinh chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh mô liên kết typ II (MPS II, hội chứng Hunter) là một rối loạn tích lũy thể tiêu bào liên quan đến nhiễm sắc thể X do sự thiếu hụt enzym iduronat-2-sulfatase (I2S) gây ra. I2S phân cắt các gốc 2-O-sulfat ngoài cùng ra khỏi các glycosaminoglycan (GAG) dermatan sulfat và heparan sulfat. Do việc mất hoặc thiếu hụt enzym I2S ở các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter, GAG sẽ tích tụ tăng dần trong thể tiêu bào của nhiều loại kiểu tế bào, gây ra xung huyết tế bào, phì đại cơ quan, hủy mô, và loạn chức năng hệ cơ quan.

Nói chung, các biểu hiện trên cơ thể của các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter bao gồm cả triệu chứng sinh dưỡng lẫn thần kinh. Ví dụ, trong một số trường hợp mắc hội chứng Hunter, sự ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương sẽ dẫn đến đáp ứng muộn tăng dần và các vấn đề về hệ thần kinh. Mặc dù các triệu chứng không mang neuron thần kinh của hội chứng Hunter nói chung không xuất hiện khi mới sinh, sau một khoảng thời gian, sự tích tụ GAG tăng dần trong các tế bào của cơ thể có thể có tác động đáng kể đến các mô ngoại vi của cơ thể. Sự tích tụ GAG trong mô ngoại vi khiến cho mặt của bệnh nhân bị thô cứng và khiến cho trán gồ, mũi tẹt và lưỡi to, các dấu hiệu chỉ báo bệnh nhân mắc hội chứng Hunter. Tương tự, sự tích tụ GAG có thể tác động bất lợi đến hệ cơ quan của cơ thể. Biểu hiện ban đầu như làm dày vách tim, phổi và khí đạo, và làm phì đại bất thường gan, lá lách và thận, các thay đổi đáng kể này có thể dẫn đến suy nhược cơ quan đáng kể ở diện rộng. Kết quả là, hội chứng Hunter luôn nghiêm trọng, tiến triển, và làm giảm tuổi thọ.

Liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (enzyme replacement therapy – ERT) là liệu pháp điều trị đã được chấp nhận để điều trị hội chứng Hunter (MPS II), mà bao

gồm việc cho các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter dùng enzym I2S ngoại sinh thay thế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, phương pháp cải tiến để tinh chế protein I2S được tạo ra theo kỹ thuật tái tổ hợp cho liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế. Sáng chế, một phần, được dựa trên phát hiện đáng ngạc nhiên rằng protein I2S tái tổ hợp có thể được tinh chế từ các chất liệu sinh học chưa được xử lý, như môi trường nuôi cấy tế bào chứa I2S, bằng cách áp dụng quy trình bao gồm chỉ có bốn cột sắc ký. Quy trình đã được chấp nhận để tinh chế I2S tái tổ hợp cho liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế bao gồm 6 cột sắc ký. Như đã được bộc lộ trong phần ví dụ, các protein I2S tái tổ hợp được tinh chế bằng cách áp dụng quy trình bốn cột theo sáng chế phù hợp với các yêu cầu về độ tinh khiết ở Mỹ và nhiều nước khác. Ngoài ra, việc tinh chế enzym I2S tái tổ hợp theo sáng chế vẫn giữ được tỷ lệ phần trăm C_α-formylglyxin (FGly) ở mức cao (ví dụ, cao hơn 70% và tối đa đến 100%), mà là quan trọng đối với hoạt tính của enzym I2S, và các đặc tính khác biệt như hàm lượng axit sialic và bản đồ glycan mà có thể tạo điều kiện thuận lợi cho độ sinh khả dụng và/hoặc việc hướng đích protein I2S tái tổ hợp đến thể tiêu bào. Do đó, sáng chế đề xuất quy trình hiệu quả, rẻ hơn, và nhanh hơn để tinh chế protein I2S tái tổ hợp. Sáng chế là đặc biệt hữu dụng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein I2S tái tổ hợp từ chế phẩm không tinh khiết bằng cách áp dụng quy trình trên cơ sở một hoặc nhiều bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký kiểu hỗn hợp, và sắc ký tương tác kỵ nước. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm ít hơn 6 (ví dụ, ít hơn 5, ít hơn 4, hoặc ít hơn 3) bước sắc ký. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm 2, 3, 4 hoặc 5 bước sắc ký. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm 4 bước sắc ký. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế theo sáng chế chứa protein của tế bào chủ (Host Cell Protein – HCP) với lượng ít hơn 100ng/mg (ví dụ, HCP với lượng ít hơn 90ng/mg, HCP với lượng ít hơn 80ng/mg, HCP với lượng ít hơn 70ng/mg, HCP

với lượng ít hơn 60ng/mg, HCP với lượng ít hơn 50ng/mg, HCP với lượng ít hơn 40ng/mg, HCP với lượng ít hơn 30ng/mg, HCP với lượng ít hơn 20ng/mg, HCP với lượng ít hơn 10ng/mg).

Theo một số phương án, sắc ký trao đổi anion thích hợp là sắc ký Q. Theo một số phương án, sắc ký trao đổi cation thích hợp là sắc ký SP. Theo một số phương án, sắc ký kiểu hỗn hợp thích hợp là sắc ký hydroxyapatit (HA). Theo một số phương án, sắc ký tương tác kỵ nước thích hợp là sắc ký phenyl.

Được dự tính rằng sắc ký trao đổi anion (ví dụ, cột O), sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP), sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA), và sắc ký tương tác kỵ nước (ví dụ, cột phenyl) có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế thực hiện sắc ký trao đổi anion (ví dụ, cột O), sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP), sắc ký kiểu phối hợp (ví dụ, cột HA), và sắc ký tương tác kỵ nước (ví dụ, cột phenyl) theo thứ tự này.

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 hoặc 7,0) và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 20mS/cm (ví dụ, 10mS/cm, 11mS/cm, 12mS/cm, 13mS/cm, 14mS/cm, 15mS/cm, 16mS/cm, 17mS/cm, 18mS/cm, 19mS/cm, hoặc 20mS/cm) trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi anion (ví dụ, cột Q). Theo một số phương án, độ pH được điều chỉnh bằng cách sử dụng natri axetat 1M. Theo một số phương án, độ dẫn điện được điều chỉnh bằng cách sử dụng natri clorua 5M. Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi anion, khi đã được nạp, được rửa bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa chứa nồng độ muối (ví dụ, NaCl) nằm trong khoảng từ 140mM đến 200mM (ví dụ, khoảng 140mM, 145mM, 150mM, 155mM, 160mM, 165mM, 170mM, 175mM, 180mM, 185mM, 190mM, 195mM, hoặc 200mM) với độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 hoặc 7,0). Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi anion được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải chứa gradien muối tuyến tính (ví dụ, NaCl). Theo một số phương án, gradien NaCl tuyến tính thích hợp chứa NaCl nằm trong khoảng từ 0mM đến 500mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 0mM đến 400mM, nằm trong khoảng từ 0mM đến 350mM, nằm trong khoảng từ 0mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 50mM đến 500mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến

500mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến 450mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến 400mM).

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 20mS/cm (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 15mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 10mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 8mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 6mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 4mS/cm, nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 4mS/cm) trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP). Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ dẫn điện nằm trong khoảng từ khoảng 2mS/cm đến 4mS/cm (ví dụ, 2mS/cm, 2,5mS/cm, 3mS/cm, 3,5mS/cm, hoặc 4mS/cm) trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP). Theo một số phương án, độ dẫn điện được điều chỉnh bằng cách pha loãng dịch rửa giải từ cột sắc ký trao đổi anion với H₂O theo tỷ lệ khoảng 1 đến 2:1 (ví dụ, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, hoặc 2:1). Theo một số phương án, độ dẫn điện được điều chỉnh bằng cách lọc thẩm tách. Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi cation được chạy ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0 hoặc 6,5). Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi cation được chạy bằng dung dịch đệm chứa nồng độ phosphat (ví dụ, NaPO₄) nằm trong khoảng từ 0,01M đến 0,1M (ví dụ, khoảng 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M, 0,05M, 0,06M, 0,07M, 0,08M, 0,09M, hoặc 0,1M). Theo một số phương án, độ pH thích hợp nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, hoặc 6,5).

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến nồng độ phosphat (ví dụ, NaPO₄) nằm trong khoảng từ 0,001M đến 0,01M (ví dụ, khoảng 0,001M, 0,002M, 0,003M, 0,004M, 0,005M, 0,006M, 0,007M, 0,008M, 0,009M, hoặc 0,01M) và độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, hoặc 6,5) trước khi nạp lên cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA). Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA), khi đã được nạp, được rửa bằng dung dịch đệm rửa chứa phosphat (ví dụ, natri hoặc kali phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 1mM đến 10mM) ở hoặc gần độ pH trung tính. Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp đã nạp (ví dụ,

cột HA) được rửa bằng dung dịch đệm rửa có nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 10mM đến 20mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 10mM đến 18mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 16mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 15mM, nằm trong khoảng từ 12mM đến 20mM, nằm trong khoảng từ 14mM đến 18mM, nằm trong khoảng từ 14mM đến 16mM). Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp đã nạp (ví dụ, cột HA) được rửa bằng dung dịch đệm rửa có nồng độ phosphat bằng hoặc cao hơn 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM, 15mM, 16mM, 17mM, 18mM, 19mM, 20mM. Theo một số phương án, việc rửa giải cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA) được thực hiện bằng gradien dung dịch đệm phosphat. Theo một số phương án, dung dịch đệm rửa giải thích hợp có thể có gradien phosphat của natri phosphat hoặc kali phosphat nằm trong khoảng từ 1mM đến 400mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 150mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 100mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 350mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 250mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 150mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 140mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 130mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 120mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 110mM, từ 10mM đến 100mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 90mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 80mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 70mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 60mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM). Theo một số phương án, việc rửa giải cột HA được thực hiện từng bước để làm tăng nồng độ phosphat trong dung dịch đệm rửa giải. Theo một số phương án, các dung dịch đệm rửa giải từng bước có thể có nồng độ phosphat (ví dụ, natri phosphat) được chọn trong số 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 110mM, 120mM, 130mM, 140mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM. Theo một số phương án, tiến hành rửa giải cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA) bằng dung dịch đệm rửa giải có nồng độ phosphat (ví dụ, natri phosphat) nằm trong khoảng từ 50mM đến 150mM (ví dụ, chọn trong số nồng độ phosphat (ví dụ, natri phosphat) là 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 110mM, 120mM, 130mM, 140mM, 150mM, và các cách kết hợp của chúng).

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến nồng độ muối (ví dụ, NaCl) nằm trong khoảng từ 0,5M đến 2,0M (ví dụ, khoảng 0,5M, 1,0M, 1,1M, 1,2M, 1,3M, 1,4M, 1,5M, 1,6M, 1,7M, 1,8M, 1,9M, hoặc 2,0M NaCl) ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0) trước khi nạp lên cột sắc ký tương tác kỵ nước (ví dụ, cột phenyl). Theo một số phương án, cột sắc ký tương tác kỵ nước, khi đã được nạp, được rửa bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa chứa nồng độ muối (ví dụ, NaCl) nằm trong khoảng từ 0,5M đến 2,0M (ví dụ, NaCl khoảng 0,5M, 1,0M, 1,1M, 1,2M, 1,3M, 1,4M, 1,5M, 1,6M, 1,7M, 1,8M, 1,9M, hoặc 2,0M) ở độ pH khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0). Theo một số phương án, cột sắc ký tương tác kỵ nước được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải chứa muối (ví dụ, NaCl) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1M đến 0,5M (ví dụ, khoảng 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, hoặc 0,5M NaCl) ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0).

Theo một số phương án, từng bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký kiểu hỗn hợp, và cột sắc ký tương tác kỵ nước có chiều cao nằm trong khoảng từ 14cm đến 25cm (ví dụ, nằm trong khoảng từ 15cm đến 25cm, nằm trong khoảng từ 15cm đến 20cm, nằm trong khoảng từ 14cm đến 24cm, nằm trong khoảng từ 14cm đến 22cm, nằm trong khoảng từ 14cm đến 20cm, hoặc nằm trong khoảng từ 16cm đến 18cm). Theo một số phương án, mỗi sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký kiểu hỗn hợp, và cột sắc ký tương tác kỵ nước có chiều cao khoảng 14cm, 15cm, 16cm, 17cm, 18cm, 19cm, 20cm, 21cm, 22cm, 23cm, 24cm, hoặc 25cm.

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước làm bất hoạt virus trước khi nạp chế phẩm không tinh khiết vào cột sắc ký thứ nhất. Theo một số phương án, bước làm bất hoạt virus bao gồm việc bổ sung chất tẩy rửa vào chế phẩm không tinh khiết. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước loại bỏ virus sau cột sắc ký cuối cùng. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách. Theo một số phương án, bước siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách bao gồm việc trao đổi protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế với dung dịch đệm của dược phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế được áp dụng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng từ 50% (ví dụ, ít nhất khoảng từ 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO NO:1. Theo một số phương án, sáng chế được dùng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO NO:1.

Theo một số phương án, sáng chế được áp dụng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp tạo ra bởi tế bào của động vật có vú được nuôi cấy trong huyền phù trong môi trường không chứa huyết thanh. Theo một số phương án, môi trường không chứa huyết thanh thích hợp đối với sáng chế không chứa thành phần có nguồn gốc động vật. Theo một số phương án, môi trường không chứa huyết thanh thích hợp đối với sáng chế là môi trường xác định về mặt hóa học. Theo một số phương án, tế bào của động vật có vú được nuôi cấy trong thùng phản ứng sinh học. Theo một số phương án, tế bào của động vật có vú cùng biểu hiện protein I2S tái tổ hợp và enzym sinh ra formylglyxin (FGE). Theo một số phương án, tế bào của động vật có vú là tế bào của người.

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết được dùng trong phương pháp theo sáng chế được chuẩn bị từ môi trường không chứa huyết thanh chứa protein I2S tái tổ hợp được tiết ra từ tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết được dùng trong phương pháp theo sáng chế được rửa đông từ chế phẩm môi trường được làm đông lạnh.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế chứa, tính trung bình, từ 16 đến 22 (ví dụ, từ 16 đến 21, từ 16 đến 20, từ 16 đến 19, từ 17 đến 22, từ 17 đến 21, từ 17 đến 20, từ 17 đến 19) đơn vị axit sialic trong mỗi phân tử. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế chứa, tính trung bình, 16, 17, 18, 19, 20, 21, hoặc 22 sialic axit trong mỗi phân tử.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế có mức độ chuyển hóa ít nhất khoảng 70% (ví dụ, ít nhất khoảng 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) gốc cystein tương ứng với Cys59 của I2S của người (SEQ ID NO:1) thành C_α-formylglyxin (FGly). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế có mức độ chuyển hóa hầu như 100% gốc cystein tương ứng với Cys59 của I2S của người (SEQ ID NO:1) thành C_α-formylglyxin (FGly). Theo

một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế có đặc hiệu hoạt tính ít nhất 20U/mg, 30U/mg, 40U/mg, 50U/mg, 60U/mg, 70U/mg, 80U/mg, 90U/mg, hoặc 100U/mg như được xác định theo thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế được xác định tính chất với mức độ hấp thu vào tế bào nhiều hơn 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, như xác định được theo thử nghiệm hấp thu *in vitro*.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp tinh chế theo sáng chế được xác định tính chất với bản đồ glycan chứa bảy nhóm đỉnh lần lượt là dấu hiệu chỉ báo về protein I2S trung tính (nhóm đỉnh 1), protein I2S đã được mono-sialyl hóa (nhóm đỉnh 2), protein I2S đã được di-sialyl hóa (nhóm đỉnh 3), protein I2S đã được monophosphoryl hóa (nhóm đỉnh 4), protein I2S đã được tri-sialyl hóa (nhóm đỉnh 5), protein I2S đã được tetra-sialyl hóa (nhóm đỉnh 6), và protein I2S đã được diphosphoryl hóa (nhóm đỉnh 7). Theo một số phương án, bản đồ glycan được tạo ra sau khi bị phân cắt bởi neuraminidaza. Theo các phương án khác, bản đồ glycan được tạo ra sau khi bằng phosphatase kiềm.

Trong số các đối tượng khác, sáng chế đề xuất protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế như được bộc lộ trong bản mô tả này, và các dược phẩm hoặc chế phẩm chứa nó. Theo một số phương án, chế phẩm được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch, dưới da và/hoặc qua đường nội tủy mạc. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị hội chứng Hunter bằng cách cho đối tượng có nhu cầu điều trị dùng I2S tái tổ hợp đã được tinh chế, dược phẩm hoặc chế phẩm chứa nó.

Thuật ngữ “protein I2S”, “I2S”, “enzym I2S”, hoặc các biến thể ngữ pháp tương đương, được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm chứa phân tử protein I2S tái tổ hợp trừ khi được chỉ rõ khác.

Các thuật ngữ “khoảng” và “khoảng chừng” được dùng trong bản mô tả này là tương đương với nhau. Số bất kỳ được dùng trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này kèm theo hoặc không kèm theo khoảng/khoảng chừng có nghĩa bao trùm mọi dao động bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Các dấu hiệu, các mục đích, và các ưu điểm khác theo sáng chế được thể hiện rõ trong phần Mô tả chi tiết sáng chế dưới đây. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, phần Mô

tả chi tiết sáng chế, trong khi biểu thị các phương án theo sáng chế, chỉ được đưa ra nhằm để minh họa, mà không nhằm để giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi và các cải biến khác nhau trong phạm vi của sáng chế là rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét phần Mô tả chi tiết sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ kèm theo, mà cùng nhau tạo thành bộ hình vẽ, chỉ nhằm mục đích minh họa, mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Hình 1 thể hiện sơ đồ làm ví dụ để tinh chế I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh.

Hình 2 thể hiện bản đồ peptit làm ví dụ của I2S AF tái tổ hợp đã được tinh chế so với I2S tham chiếu.

Hình 3 thể hiện phân tích SDS-PAGE (Bạc) làm ví dụ về I2S AF tái tổ hợp đã được tinh chế.

Hình 4 thể hiện phân tích biên dạng điện tích làm ví dụ của I2S AF tái tổ hợp đã được tinh chế được đánh giá theo sắc ký trao đổi ion.

Hình 5 thể hiện biên dạng bản đồ glycan làm ví dụ của I2S AF tái tổ hợp đã được tinh chế.

Hình 6 thể hiện phân tích làm ví dụ về hoạt tính (U/mg) sau bước làm bất hoạt virut của quần thể thu hoạch được làm trong chứa I2S tái tổ hợp theo UPB.

Hình 7 thể hiện phân tích SEC-HPLC làm ví dụ sau bước làm bất hoạt virut của quần thể thu hoạch được làm trong chứa I2S tái tổ hợp theo UPB.

Hình 8 thể hiện SDS-PAGE làm ví dụ được xử lý bằng cách nhuộm bạc protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế.

Hình 9 thể hiện bản đồ peptit làm ví dụ đối với enzym I2S tái tổ hợp đã được tinh chế được tạo ra từ dòng tế bào I2S-AF 2D được cho sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy không chứa huyết thanh (khối bên trên) so với tham chiếu.

Hình 10 thể hiện biên dạng glycan làm ví dụ được tạo ra cho enzym I2S tái tổ hợp đã được tinh chế được tạo ra bằng cách sử dụng các dòng tế bào I2S-AF 2D và 4D được cho sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh so với tham chiếu.

Hình 11 thể hiện biên dạng điện tích làm ví dụ được tạo ra cho enzym I2S tái tổ hợp đã được tinh chế được tạo ra bằng cách sử dụng dòng tế bào I2S-AF 2D được cho sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh so với I2S đối chứng tham chiếu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để dễ hiểu sáng chế hơn, đầu tiên, một số thuật ngữ được xác định. Các định nghĩa khác đối với các thuật ngữ sau và các thuật ngữ khác được nêu dưới đây trong toàn bộ bản mô tả này.

Khoảng hoặc *khoảng chừng*: thuật ngữ “khoảng” hoặc “khoảng chừng”, như được áp dụng cho một hoặc nhiều trị số đáng quan tâm, được dùng trong bản mô tả này để chỉ trị số là tương tự với trị số tham chiếu đã nêu. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “khoảng” hoặc “khoảng chừng” được dùng để chỉ khoảng trị số trong khoảng 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, hoặc thấp hơn theo cả hai chiều (lớn hơn hoặc nhỏ hơn) trị số tham chiếu đã nêu trừ khi có quy định khác hoặc rõ ràng theo cách khác tùy theo ngữ cảnh (trừ trị số vượt quá trị số có thể là 100%).

Có hoạt tính sinh học: thuật ngữ “có hoạt tính sinh học” được dùng trong bản mô tả này để chỉ đặc tính của chất bất kỳ có hoạt tính trong hệ sinh học (ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào, cơ quan, v.v.). Ví dụ, chất, mà khi được dùng cho cơ quan, có tác dụng sinh học trên cơ quan đó, được coi là có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học cũng có thể được xác định bằng các thử nghiệm *in vitro* (ví dụ, các thử nghiệm enzym *in vitro* như thử nghiệm giải phóng sulfat). Theo các phương án cụ thể, khi protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học, phần protein hoặc polypeptit có ít nhất một hoạt tính sinh học của protein hoặc polypeptit thường được gọi là phần “có hoạt tính sinh học”. Theo một số phương án, protein được tạo ra và/hoặc được tinh chế từ hệ dịch nuôi cấy tế bào, mà biểu thị hoạt tính sinh học khi được dùng cho đối tượng. Theo một số phương án, protein cần phải xử lý tiếp để có hoạt tính sinh học. Theo một số phương án, protein cần được cải biến sau dịch mã như, nhưng không chỉ giới hạn ở, glycosyl hóa (ví dụ, sialyl hóa), farnysyl hóa, phân cắt, gấp nếp, chuyển hóa formylglyxin và tổ hợp của chúng, để có hoạt tính sinh học. Theo một số phương án,

protein được tạo ra ở tiền dạng (tức là dạng chưa thành thực), có thể cần phải cải biến thêm để trở thành có hoạt tính sinh học.

Thụ thể manozơ-6-phosphat độc lập với cation (cation-independent mannose-6-phosphate receptor -*CI-MPR*): thuật ngữ “thụ thể manozơ-6-phosphat độc lập với cation (CI-MPR)” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tế bào thụ thể mà liên kết với các đuôi manozơ-6-phosphat (M6P) trên các tiền chất axit hydrolaza trong thể Golgi mà cũng dự định đi đến thể tiêu bào. Ngoài manozơ-6-phosphat, CI-MPR cũng liên kết các protein khác bao gồm IGF-II. CI-MPR còn được gọi là “thụ thể M6P/IGF-II”, “thụ thể CI-MPR/thụ thể IGF-II”, “IGF-II” hoặc “thụ thể IGF2”. Các thuật ngữ này và các chữ viết tắt của chúng được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này.

Sắc ký: thuật ngữ “sắc ký” được dùng trong bản mô tả này để chỉ kỹ thuật tách hỗn hợp. Nói chung, hỗn hợp này được hòa tan trong chất lỏng được gọi là “pha động”, mà pha này mang hỗn hợp này đi qua cấu trúc giữ nguyên liệu khác được gọi là “pha tĩnh”. Sắc ký cột là kỹ thuật tách trong đó đệm tĩnh nằm bên trong ống, tức là cột.

Chất pha loãng: thuật ngữ “chất pha loãng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất pha loãng được dùng (ví dụ, an toàn và không độc để dùng cho người) hữu dụng để điều chế được phẩm hoàn nguyên được. Các chất pha loãng làm ví dụ bao gồm nước vô khuẩn, nước kim hãm vi khuẩn để tiêm (BWFI), dung dịch được đệm độ pH (ví dụ, nước muối đệm phosphat), nước dung dịch muối vô khuẩn, dung dịch Ringer hoặc dung dịch dextroza.

Rửa giải: thuật ngữ “rửa giải” được dùng trong bản mô tả này để chỉ quy trình chiết một chất liệu ra khỏi chất liệu khác bằng cách rửa bằng dung môi. Ví dụ, trong sắc ký trao đổi ion, quy trình rửa giải rửa đã nạp để loại bỏ ion bị bắt giữ.

Dịch rửa giải: thuật ngữ “dịch rửa giải” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hỗn hợp gồm “chất mang” pha động và chất liệu phân tích thu được từ việc sắc ký, thường là kết quả của việc rửa giải.

Liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (enzyme replacement therapy – ERT): thuật ngữ “liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (ERT)” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chiến lược điều trị bất kỳ mà điều chỉnh sự thiếu hụt enzym bằng cách cung cấp enzym đã mất. Theo một số phương án, enzym đã mất được cung cấp bằng cách

dùng qua đường nội tủy mạc. Theo một số phương án, enzym đã mất được cung cấp bằng cách truyền vào dòng máu. Khi được dùng, enzym được các tế bào hấp thu và vận chuyển đến thể tiêu bào, mà ở đó enzym hoạt động để loại bỏ chất liệu đã tích tụ trong thể tiêu bào do thiếu hụt enzym. Nói chung, để liệu pháp điều trị thể tiêu bào bằng enzym thay thế có hiệu quả, enzym điều trị được phân phối đến thể tiêu bào ở các tế bào thích hợp trong mô đích nơi dễ thấy có sự khiếm khuyết về mặt tích lũy.

Làm cân bằng hoặc việc cân bằng: các thuật ngữ “làm cân bằng” hoặc “việc cân bằng” liên quan đến sắc ký được dùng trong bản mô tả này để chỉ quy trình đưa chất lỏng thứ nhất (ví dụ, dung dịch đệm) đến trạng thái cân bằng bằng một chất lỏng khác, thường để đạt được tình trạng ổn định và phân bố đồng đều các thành phần của chất lỏng (ví dụ, dung dịch đệm). Ví dụ, theo một số phương án, cột sắc ký có thể được làm cân bằng bằng cách cho một hoặc nhiều thể tích cột của chất lỏng mong muốn (ví dụ, dung dịch đệm) chạy qua cột.

Cải thiện, làm tăng, hoặc làm giảm: các thuật ngữ “cải thiện”, “làm tăng” hoặc “làm giảm”, hoặc các biến thể ngữ pháp tương đương, được dùng trong bản mô tả này để chỉ trị số tương đối với phép đo các thông số ban đầu, như phép đo trên cùng cá thể trước khi khởi đầu phép điều trị được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc phép đo ở cá thể đối chứng (hoặc nhiều cá thể đối chứng) khi không có phép điều trị được bộc lộ trong bản mô tả này. “Cá thể đối chứng” là cá thể bị mắc cùng dạng bệnh tích lũy ở thể tiêu bào như cá thể được điều trị, là người ở cùng khoảng độ tuổi như cá thể được điều trị (để đảm bảo rằng các giai đoạn bệnh ở cá thể được điều trị và cá thể đối chứng là tương đương).

Tạp chất: thuật ngữ “tạp chất” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các chất chứa bên trong một lượng chất lỏng, khí, hoặc rắn hạn chế, mà khác biệt so với thành phần hóa học của nguyên liệu hoặc hợp chất đích. Các tạp chất này còn được gọi là các chất tạp nhiễm.

Nhóm liên kết: thuật ngữ “nhóm liên kết” được dùng trong bản mô tả này để chỉ, trong protein dung hợp, trình tự axit amin mà không phải là trình tự axit amin xuất hiện tại một vị trí cụ thể trong protein tự nhiên và thường được thiết kế ở dạng linh hoạt hoặc để xen vào cấu trúc, như vòng xoắn α , giữa hai gốc protein. Nhóm liên kết còn được gọi là phần đệm.

Nạp: thuật ngữ “nạp” được dùng trong bản mô tả này để chỉ, trong sắc ký, việc bổ sung chất lỏng hoặc chất rắn chứa mẫu vào cột. Theo một số phương án, sau đó, các thành phần cụ thể của mẫu đã nạp vào cột bị bắt giữ khi mẫu nạp đi qua cột này. Theo một số phương án, các thành phần cụ thể của mẫu nạp vào cột không bị cột bắt giữ, hoặc “chảy qua”, khi mẫu nạp đi qua cột.

Polypeptit: “polypeptit” được dùng trong bản mô tả này thường là chuỗi chứa ít nhất hai axit amin đã được gắn vào nhau nhờ liên kết peptit. Theo một số phương án, polypeptit có thể chứa ít nhất từ 3 đến 5 axit amin, mỗi axit amin được gắn vào nhau bằng ít nhất một liên kết peptit. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng đôi khi các polypeptit bao gồm các axit amin “không phải là axit amin tự nhiên” hoặc các thực thể khác mà dù sao cũng tùy ý có khả năng hợp nhất vào chuỗi polypeptit.

Thu gom: thuật ngữ “thu gom” liên quan đến sắc ký được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc kết hợp một hoặc nhiều phân đoạn chất lỏng đã đi qua cột cùng với nhau. Ví dụ, theo một số phương án, một hoặc nhiều phân đoạn chứa thành phần mong muốn là mẫu đã được tách theo phương pháp sắc ký (ví dụ, “phân đoạn pic”) có thể “được thu gom” với nhau tạo ra phân đoạn “thu gom” đơn nhất.

Thuật ngữ “enzym thay thế” được dùng trong bản mô tả này để chỉ enzym bất kỳ mà có thể hoạt động để thay thế cho ít nhất một phần enzym bị thiếu hụt hoặc bị mất ở bệnh cần được điều trị. Theo một số phương án, thuật ngữ “enzym thay thế” được dùng để chỉ enzym bất kỳ mà có thể hoạt động để thay thế ít nhất một phần enzym bị thiếu hụt hoặc bị mất trong thể tiêu bào ở bệnh tích lũy ở thể tiêu bào cần được điều trị. Theo một số phương án, enzym thay thế có khả năng làm giảm chất liệu tích tụ ở thể tiêu bào của động vật có vú hoặc có thể cứu chữa hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh tích lũy ở thể tiêu bào. Enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế bao gồm cả enzym thông thường hoặc enzym được cải biến ở thể tiêu bào và có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp và tổng hợp hoặc được tinh chế từ các nguồn tự nhiên. Enzym thay thế có thể là enzym tái tổ hợp, enzym tổng hợp, enzym hoạt hóa gen hoặc enzym tự nhiên.

Có thể hòa tan được: thuật ngữ “có thể hòa tan được” được dùng trong bản mô tả này để chỉ khả năng của một tác nhân điều trị bệnh trong việc tạo ra dung dịch đồng

nhất. Theo một số phương án, độ hòa tan của tác nhân điều trị bệnh trong dung dịch được dùng và nhờ đó mà được vận chuyển đến vị trí hoạt động đích là đủ để phân phối lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của tác nhân điều trị bệnh đến vị trí hoạt động đích. Một vài yếu tố có thể ảnh hưởng đến độ hòa tan của các tác nhân điều trị bệnh. Ví dụ, các yếu tố liên quan mà có thể ảnh hưởng đến độ hòa tan của protein bao gồm cường độ ion, trình tự axit amin và sự có mặt của các tác nhân cùng hòa tan khác hoặc muối khác (ví dụ, muối canxi). Theo một số phương án, tác nhân điều trị bệnh theo sáng chế hòa tan được trong được phẩm tương ứng.

Độ ổn định: thuật ngữ “ổn định” được dùng trong bản mô tả này để chỉ khả năng của tác nhân điều trị bệnh (ví dụ, enzym tái tổ hợp) trong việc duy trì hiệu quả điều trị bệnh của nó (ví dụ, toàn bộ hoặc đại đa số hoạt tính sinh học và/hoặc độ toàn vẹn hóa lý được dự định của nó) trong một thời gian kéo dài. Độ ổn định của tác nhân điều trị bệnh, và khả năng để được phẩm duy trì độ ổn định của tác nhân điều trị bệnh này, có thể được đánh giá trong một thời gian kéo dài (ví dụ, trong ít nhất 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng, 18 tháng, 24 tháng, 30 tháng, 36 tháng hoặc lâu hơn). Liên quan đến chế phẩm, chế phẩm ổn định là chế phẩm mà trong đó tác nhân điều trị bệnh về cơ bản giữ được độ toàn vẹn vật lý và/hoặc hóa học và hoạt tính sinh học khi bảo quản và trong khi xử lý (như làm đông/rã đông, trộn cơ học và làm đông khô nhanh). Độ ổn định của protein có thể được đo bằng cách tạo ra khối kết tụ phân tử lượng cao (HMW), làm mất hoạt tính enzym, tạo ra các đoạn peptit và thay đổi biên dạng điện tích.

Xử lý virus: thuật ngữ “xử lý virus” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc “loại bỏ virus”, trong đó virus đơn giản được lấy ra khỏi mẫu, hoặc “làm bất hoạt virus”, trong đó virus vẫn còn ở trong mẫu nhưng không ở dạng có thể lây nhiễm. Theo một số phương án, việc loại bỏ virus có thể áp dụng các kỹ thuật lọc nano và/hoặc sắc ký trong số các kỹ thuật khác. Theo một số phương án, việc làm bất hoạt virus có thể sử dụng cách làm bất hoạt bằng dung môi, cách làm bất hoạt bằng chất tẩy rửa, diệt khuẩn bằng phương pháp Paxto, cách làm bất hoạt bằng độ pH axit, và/hoặc cách làm bất hoạt bằng tia cực tím, trong số các cách khác.

Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, phương pháp cải tiến để tinh chế protein I2S tái tổ hợp cho liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế trên cơ sở quy trình

bao gồm ít hơn 6 bước sắc ký. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein I2S tái tổ hợp từ chế phẩm không tinh khiết bằng cách áp dụng quy trình trên cơ sở một hoặc nhiều sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký kiểu hỗn hợp, và sắc ký tương tác kỵ nước. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein I2S tái tổ hợp từ chế phẩm không tinh khiết bằng cách thực hiện sắc ký Q, sắc ký hydroxyapatit (HA), sắc ký SP, và sắc ký phenyl. Sáng chế còn đề xuất protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế và phương pháp sử dụng nó.

Nhiều khía cạnh khác của sáng chế được bộc lộ một cách chi tiết hơn trong các tiểu phần dưới đây. Việc sử dụng các tiểu phần này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Mỗi tiểu phần có thể áp dụng cho khía cạnh bất kỳ của sáng chế. Trong bản mô tả này, việc sử dụng “hoặc” có nghĩa là “và/hoặc” trừ khi có quy định khác.

Protein I2S tái tổ hợp

Protein I2S được dùng trong bản mô tả này là protein hoặc phần protein bất kỳ mà có thể thay thế ít nhất một phần hoạt tính của protein Iduronat-2-sulfatase (I2S) có trong tự nhiên hoặc cứu chữa một hoặc nhiều kiểu hình hoặc các triệu chứng liên quan đến sự thiếu hụt I2S. Thuật ngữ “enzym I2S” và “protein I2S”, và các biến thể ngữ pháp tương đương được dùng trong bản mô tả này, được sử dụng thay đổi lẫn nhau.

Thông thường, protein I2S của người được tạo ra ở dạng tiền chất. Dạng tiền chất của I2S của người chứa peptit dẫn truyền tín hiệu (các gốc axit amin 1 đến 25 của tiền chất có chiều dài đầy đủ), tiền-peptit (các gốc axit amin 26 đến 33 của tiền chất có chiều dài đầy đủ), và mạch (các gốc 34 đến 550 của tiền chất có chiều dài đầy đủ) mà có thể được xử lý tiếp thành mạch dài 42kDa (các gốc 34 đến 455 của tiền chất có chiều dài đầy đủ) và mạch dài 14kDa (các gốc 446 đến 550 của tiền chất có chiều dài đầy đủ). Nói chung, dạng tiền chất còn được gọi là tiền chất có chiều dài đầy đủ hoặc protein I2S có chiều dài đầy đủ, mà chứa 550 axit amin. Trình tự axit amin của dạng thành thực (SEQ ID NO:1) có peptit dẫn truyền tín hiệu đã bị loại ra và tiền chất có chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:2) của kiểu thông thường tiêu biểu hoặc protein I2S của người có trong tự nhiên được thể hiện trong Bảng 1. Peptit dẫn truyền tín hiệu được gạch chân. Ngoài ra, các trình tự axit amin của dạng đồng chức năng a và b của tiền chất protein I2S của người cũng được thể hiện trong Bảng 1, lần lượt là trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 và 4.

Bảng 1. Iduronat-2-sulfataza của người

Dạng thành thực	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNI DQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTR LYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVF HPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGP DGEHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKM KTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAP DPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP IPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLAN STIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYV PGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVSFHVLCREGK NLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIP QWNSDKPSLKDIDKIMGYRTIDYRYTVWVGFPNDEF LANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQGGDLFQL LMP(SEQ ID NO:1)
Tiền chất có chiều dài đầy đủ (Dạng đồng chức năng a)	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDAL NVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQ NAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVH AGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVD VLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAY NPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDVDFQRKIRQSYFA SVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIAFTSDHGWALG EHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKL FPYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLA GLQVPPRCVPVSFHVLCREGK NLLKHFRFRDLEEDPY LPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIDKIMGY SIRTIDYRYTVWVGFPNDEF LANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP(SEQ ID NO:2)
Tiền chất dạng đồng chức năng b	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDAL NVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQ NAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVH AGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVD VLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAY NPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDVDFQEDQSSTGFR LKTSSSTRKYK (SEQ ID NO:3)

Tiền chất dạng đồng chức năng c	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDAL NVLIIIVDDLRLSLGCGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQ NAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVH AGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVD VLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAY NPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQRKIRQSYFA SVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGFLMR TNT(SEQ ID No:4)
--	---

Do đó, theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp là protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Như được bộc lộ trong bản mô tả này, SEQ ID NO:1 thể hiện trình tự axit amin chính tắc đối với protein I2S của người. Theo một số phương án, protein I2S có thể là dạng đồng chức năng cắt và/hoặc biến thể của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, tạo ra từ việc phiên mã tại vị trí khởi đầu khác trong vùng dịch mã ở đầu tận cùng đầu tận cùng 5' của gen I2S. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S thành thực của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S thành thực của người có thể là protein I2S thành thực của người được cải biến có một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin vào so với protein I2S kiểu thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:1), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của I2S protein. Do đó, theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa một đoạn hoặc một phần của protein I2S thành thực của người.

Theo cách khác, protein I2S tái tổ hợp là protein I2S có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S có chiều dài đầy đủ của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S có chiều dài đầy đủ của người có thể là protein I2S có chiều dài đầy đủ của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin vào so với protein I2S có chiều dài đầy đủ kiểu thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:2), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với protein I2S có chiều dài đầy đủ của người (SEQ ID NO:2). Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO NO:2. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO NO:2. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO NO:2. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa một đoạn hoặc một phần protein I2S có chiều dài đầy đủ của người. Như được dùng trong bản mô tả này, protein I2S có chiều dài đầy đủ thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp là dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người có thể là dạng đồng chức năng a của protein I2S của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin so với dạng đồng chức năng a của protein I2S của người kiểu thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:3), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với dạng đồng chức năng a của protein I2S của người (SEQ ID NO:3). Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với

trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa một đoạn hoặc một phần của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Dạng đồng chức năng a của protein I2S của người được dùng trong bản mô tả này thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp là dạng đồng chức năng b của protein I2S của người. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng b của protein I2S của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng b của protein I2S của người có thể là dạng đồng chức năng b của protein I2S của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin vào so với dạng đồng chức năng b của protein I2S của người kiểu thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:4), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với dạng đồng chức năng b của protein I2S của người (SEQ ID NO:4). Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa một đoạn hoặc một phần của dạng đồng chức năng b của protein I2S của người. Như được dùng trong bản mô tả này, dạng đồng chức năng b của protein I2S của người thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S của người có thể được tạo ra theo các phương pháp làm thay đổi trình tự polypeptit mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết như được nêu trong tài liệu tổng hợp các phương pháp này. Theo

một số phương án, các thay thế bảo toàn đối với axit amin bao gồm các thay thế được thực hiện trong số các axit amin thuộc các nhóm sau: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; và (g) E, D. Theo một số phương án, “thay thế axit amin bảo toàn” được dùng để chỉ việc thay thế axit amin mà không làm thay đổi các đặc tính điện hoặc kích thước tương đối của protein mà thay thế axit amin được thực hiện trong đó.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa gốc liên kết với thụ thể trên bề mặt của các tế bào đích để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu vào tế bào và/hoặc hướng đích đến thể tiêu bào. Ví dụ, thụ thể này có thể là thụ thể mannoza-6-phosphat độc lập với cation (CI-MPR) mà liên kết với gốc mannoza-6-phosphat (M6P). Ngoài ra, CI-MPR còn liên kết với các protein khác bao gồm IGF-II. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp chứa các gốc M6P trên bề mặt protein. Cụ thể là, protein I2S tái tổ hợp có thể chứa oligosaccharit bis-phosphoryl hóa mà có ái lực liên kết cao hơn với CI-MPR. Theo một số phương án, enzym thích hợp chứa tối đa đến mức trên trung bình ít nhất là 20% oligosaccharit bis-phosphoryl hóa trên mỗi enzym. Theo một số phương án, enzym thích hợp chứa khoảng 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% oligosaccharit bis-phosphoryl hóa trên mỗi enzym.

Theo một số phương án, enzym I2S tái tổ hợp có thể được hợp nhất với gốc hướng vào thể tiêu bào mà có khả năng liên kết với thụ thể trên bề mặt của các tế bào đích. Gốc hướng vào thể tiêu bào thích hợp có thể là IGF-I, IGF-II, RAP, p97, và các biến thể, các chất đồng đẳng hoặc các đoạn của chúng (ví dụ, kể cả peptit có trình tự tương đồng ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với trình tự peptit IGF-I, IGF-II, RAP, p97 kiểu thông thường thành thực của người). Gốc hướng vào thể tiêu bào có thể được tiếp hợp hoặc hợp nhất với protein I2S hoặc enzym ở đầu tận cùng N, đầu tận cùng C hoặc bên trong.

Tạo ra protein I2S tái tổ hợp

Sáng chế có thể được áp dụng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp tạo ra được theo nhiều cách khác nhau. Ví dụ, protein I2S có thể được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp bằng cách sử dụng hệ tế bào chủ được xử lý để biểu hiện axit nucleic ghi mã I2S. Theo cách khác, protein I2S có thể được tạo ra bằng cách hoạt hóa gen I2S nội sinh.

Được dự tính rằng sáng chế có thể được áp dụng để tinh chế protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều hệ biểu hiện. Hệ biểu hiện thích hợp bao gồm, ví dụ, tế bào của trứng, baculo virus, thực vật, nấm men, hoặc động vật có vú.

Theo một số phương án, I2S enzyme được tạo ra ở tế bào của động vật có vú. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về tế bào của động vật có vú mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm dòng tế bào u tủy của chuột nhắt BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); tế bào nguyên bào võng mạc của người (PER.C6, CruCell, Leiden, Hà Lan); dòng tế bào thận của khỉ CV1 đã được biến nạp bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng tế bào thận bào thai người (HEK293 hoặc tế bào 293 đã được tách dòng phụ để sinh trưởng trong huyền phù nuôi cấy, xem tài liệu: Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59, 1977); dòng tế bào sacôm sợi của người (ví dụ, HT1080); các tế bào thận của chuột đồng sơ sinh (BHK21, ATCC CCL 10); tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung quốc +/-DHFR (CHO, Urlaub và Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216, 1980); nguyên bào sinh của chuột (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251, 1980); tế bào thận của khỉ (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1 587); các tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HeLa, ATCC CCL 2); các tế bào thận của chó (MDCK, ATCC CCL 34); các tế bào gan của chuột trâu (BRL 3A, ATCC CRL 1442); các tế bào phổi của người (W138, ATCC CCL 75); các tế bào gan của người (Hep G2, HB 8065); u tuyến vú của chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); tế bào TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan của người (Hep G2).

Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế được áp dụng để tinh chế enzyme I2S tái tổ hợp được tạo ra từ các tế bào của người (ví dụ, HT1080). Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế được áp dụng để tinh chế enzyme I2S tái tổ hợp được tạo ra từ tế bào CHO.

Nói chung, các tế bào mà được xử lý để biểu hiện tái tổ hợp I2S có thể bao gồm gen chuyển mã mã hóa protein I2S tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Cần hiểu rằng các axit nucleic ghi mã tái tổ hợp I2S có thể chứa trình tự điều biến, trình tự kiểm soát gen, gen khởi đầu, trình tự không mã hóa và/hoặc các trình tự thích hợp

khác để biểu hiện I2S tái tổ hợp. Nói chung, vùng mã hóa được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều thành phần axit nucleic.

“Trình tự điều biến” thường được dùng để chỉ các trình tự nucleotit nằm ở phía trên (trình tự không ghi mã đầu 5'), bên trong, hoặc phía dưới (trình tự không ghi mã đầu 3') của trình tự ghi mã, và có ảnh hưởng đến việc phiên mã, quy trình xử lý ARN hoặc độ ổn định, hoặc dịch mã trình tự ghi mã được liên kết. Các trình tự điều biến có thể bao gồm các gen khởi đầu, trình tự khởi đầu dịch mã, intron, và trình tự nhận biết polyadenyl hóa. Đôi khi, “trình tự điều biến” còn được gọi là “trình tự kiểm soát gen”.

“Gen khởi đầu” thường để chỉ trình tự nucleotit có khả năng kiểm soát sự biểu hiện trình tự ghi mã hoặc ARN chức năng. Nói chung, trình tự ghi mã nằm từ đầu 3' đến trình tự khởi đầu. Trình tự khởi đầu bao gồm yếu tố ngược dòng gần và xa hơn, trong đó các yếu tố xa hơn được gọi là gen tăng cường. Do đó, “gen tăng cường” là trình tự nucleotit mà có thể kích thích đoạn hoạt tính khởi đầu và có thể là yếu tố bẩm sinh của gen khởi đầu hoặc yếu tố dị tương đồng được cài xen để làm gia tăng mức độ hoặc độ đặc hiệu mô của gen khởi đầu. Gen khởi đầu có thể được lấy từ trạng thái nguyên vẹn của gen nguyên gốc, hoặc được cấu thành bởi các yếu tố khác nhau thu được từ các gen khởi đầu khác nhau tìm thấy trong tự nhiên, hoặc thậm chí còn bao gồm các đoạn nucleotit tổng hợp. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng các gen khởi đầu khác nhau có thể định hướng sự biểu hiện gen ở các loại mô hoặc tế bào khác nhau, hoặc ở các giai đoạn phát triển khác nhau, hoặc đáp ứng với các điều kiện môi trường khác nhau.

“Các trình tự không ghi mã đầu tận cùng 3'” thường được dùng để chỉ các trình tự nucleotit nằm phía sau trình tự ghi mã và bao gồm các trình tự nhận dạng sự polyadenyl hóa và các trình tự khác ghi mã trình tự điều biến sự dẫn truyền tín hiệu có khả năng ảnh hưởng đến việc xử lý ARN thông tin (mRNA) hoặc sự biểu hiện gen. Trình tự dẫn truyền tín hiệu polyadenyl hóa thường đặc trưng bởi sự ảnh hưởng đến việc kết hợp bó axit polyadenylic vào đầu tận cùng 3' của tiền chất ARN thông tin.

“Trình tự dẫn đầu dịch mã” hoặc “trình tự không ghi mã đầu tận cùng 5'” thường chỉ trình tự nucleotit nằm ở giữa trình tự khởi đầu của gen và trình tự ghi mã. Trình tự dẫn đầu dịch mã có mặt trong ARN thông tin được xử lý hoàn toàn nằm phía trước

trình tự bắt đầu dịch mã. Trình tự dẫn đầu dịch mã có thể tác động đến việc xử lý bản sao chính thành ARN thông tin, đến tính ổn định của ARN thông tin hoặc hiệu quả dịch mã.

Nói chung, các thuật ngữ “liên kết linh hoạt” hoặc “liên kết một cách linh hoạt” được dùng để chỉ việc kết hợp hai hoặc nhiều đoạn axit nucleic trên một đoạn axit nucleic đơn sao cho chức năng của một axit nucleic bị tác động bởi axit nucleic còn lại. Ví dụ, gen khởi đầu được liên kết linh hoạt với trình tự ghi mã khi nó có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện trình tự ghi mã nó (tức là trình tự ghi mã chịu sự kiểm soát phiên mã của gen khởi đầu). Các trình tự ghi mã có thể được liên kết linh hoạt với các trình tự điều biến theo chiều có nghĩa hoặc đối nghĩa.

Vùng ghi mã của gen chuyển có thể bao gồm một hoặc nhiều đột biến câm để tối ưu hóa việc sử dụng codon đối với kiểu tế bào cụ thể. Ví dụ, codon của gen chuyển I2S có thể đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở tế bào có xương sống. Theo một số phương án, codon của gen chuyển I2S có thể đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, codon của gen chuyển I2S có thể đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở tế bào của người.

Một cách tùy ý, cấu trúc có thể chứa các thành phần bổ sung như một hoặc nhiều thành phần trong số các thành phần sau: vị trí phân cắt, trình tự tăng cường, gen đánh dấu chọn lọc dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu thích hợp, gen đánh dấu có thể khuếch đại dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu thích hợp, và vùng liên kết chất nền (MAR) hoặc yếu tố đã biết khác trong lĩnh vực kỹ thuật này mà làm gia tăng sự biểu hiện của vùng mà nó được cài xen vào.

Khi được chuyển nhiễm hoặc tải nạp vào các tế bào chủ, vật truyền thích hợp có thể biểu hiện bên ngoài nhiễm sắc thể (episom) hoặc hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ.

Hoạt hóa protein I2S tái tổ hợp

Nói chung, enzym I2S tái tổ hợp được hoạt hóa bằng cách cải biến sau dịch mã đối với xystein bảo toàn (tương ứng với axit amin 59 của I2S thành thực của người) thành formylglyxin, còn được gọi là axit 2-amin-3-oxo propionic, hoặc oxo-alanin. Cải biến sau dịch mã này có thể được thực hiện bằng enzym đã được biết là enzym sinh ra formylglyxin (FGE). Do đó, theo một số phương án, enzym I2S tái tổ hợp

được tạo ra ở các tế bào mà cũng biểu hiện protein FGE. Theo các phương án cụ thể, enzym I2S tái tổ hợp được tạo ra ở các tế bào mà có mức biểu hiện protein FGE tăng hoặc cao hơn. Ví dụ, các tế bào có thể được xử lý để biểu hiện quá mức FGE kết hợp với I2S tái tổ hợp để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất chế phẩm I2S chứa enzym hoạt tính với lượng cao. Theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức FGE đạt được bằng cách biểu hiện (ví dụ, biểu hiện quá mức) FGE ngoại sinh bằng cách áp dụng công nghệ tái tổ hợp tiêu chuẩn. Theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức FGE đạt được bằng cách hoạt hóa hoặc gia tăng sự biểu hiện FGE nội sinh, ví dụ, bằng cách hoạt hóa hoặc gia tăng gen khởi đầu của gen FGE nội sinh. Trong một số trường hợp, axit nucleic ghi mã I2S tái tổ hợp và axit nucleic ghi mã protein FGE tái tổ hợp được liên kết bởi axit nucleic (ví dụ, trình tự đệm) có trình tự tương ứng với vị trí đi vào trong ribosom.

FGE bất kỳ có khả năng chuyển hóa xystein thành formylglyxin có thể được dùng theo sáng chế. Axit nucleic và các trình tự axit amin làm ví dụ về protein FGE được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2004-0229250, mà toàn bộ nội dung liên quan đến các trình tự và chính các trình tự được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Cần phải hiểu rằng các axit nucleic ghi mã tái tổ hợp FGE có thể chứa trình tự điều biến, trình tự kiểm soát gen, gen khởi đầu, trình tự không mã hóa và/hoặc trình tự thích hợp khác để biểu hiện FGE. Nói chung, vùng mã hóa được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều thành phần axit nucleic.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy tế bào

Nhiều môi trường và điều kiện nuôi cấy tế bào có thể được dùng để tạo ra protein I2S tái tổ hợp. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể được tạo ra trong môi trường chứa huyết thanh hoặc môi trường không chứa huyết thanh. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra ở môi trường không chứa động vật, tức là môi trường không có thành phần nguồn gốc động vật. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường xác định về mặt hóa học. Thuật ngữ “môi trường dinh dưỡng xác định về mặt hóa học” được dùng trong bản mô tả này để chỉ môi trường mà hầu như tất cả các thành phần hóa học là đã biết. Theo một số phương án, môi trường dinh dưỡng xác định về mặt hóa học không chứa

các thành phần có nguồn gốc động vật như huyết thanh, protein có nguồn gốc huyết thanh (ví dụ, albumin hoặc fetuin), và các thành phần khác. Trong một số trường hợp, môi trường xác định về mặt hóa học chứa một hoặc nhiều protein (ví dụ, yếu tố sinh trưởng protein hoặc xytokin). Trong một số trường hợp, môi trường dinh dưỡng xác định về mặt hóa học chứa một hoặc nhiều sản phẩm thủy phân protein. Trong trường hợp khác, môi trường dinh dưỡng xác định về mặt hóa học là môi trường không chứa protein, tức là môi trường không chứa huyết thanh mà không chứa protein, sản phẩm thủy phân hoặc các thành phần có thành phần chưa biết.

Theo một số phương án, môi trường xác định về mặt hóa học có thể được bổ sung một hoặc nhiều thành phần có nguồn gốc động vật. Các thành phần có nguồn gốc động vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, huyết thanh bào thai bò, huyết thanh ngựa, huyết thanh dê, huyết thanh lừa, huyết thanh người, và protein có nguồn gốc huyết thanh như albumin (ví dụ, albumin huyết thanh bò hoặc albumin huyết thanh người). Các điều kiện khác nhau để nuôi cấy tế bào có thể được áp dụng để tạo ra protein I2S tái tổ hợp ở quy mô lớn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nuôi cấy chai quay, nuôi cấy mẻ trong thùng phản ứng sinh học và nuôi cấy mẻ có cho ăn trong thùng phản ứng sinh học. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bằng tế bào được nuôi cấy trong huyền phù. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bằng tế bào bám dính.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy tế bào làm ví dụ được bộc lộ trong phần ví dụ. Các phương pháp và dược phẩm khác làm ví dụ để tạo ra protein I2S tái tổ hợp được bộc lộ trong đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ có tên “*Phương pháp và dược phẩm để tạo ra iduronat-2-sulfatase tái tổ hợp*” được nộp cùng ngày với đơn này, mà toàn bộ nội dung của đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Tinh chế protein I2S tái tổ hợp

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein I2S tái tổ hợp từ chế phẩm không tinh khiết bằng cách áp dụng quy trình trên cơ sở một hoặc nhiều bước sắc ký trong số sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký kiểu hỗn hợp, và sắc ký tương tác kỵ nước. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm ít hơn 6 (ví dụ, ít hơn 5, ít hơn 4, hoặc ít hơn 3) bước sắc ký. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm 2, 3, 4 hoặc 5 bước sắc ký.

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm 4 bước sắc ký. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế thực hiện sắc ký trao đổi anion, sắc ký kiểu hỗn hợp, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký tương tác kỵ nước theo thứ tự này.

Chế phẩm không tinh khiết

Chế phẩm không tinh khiết được dùng trong bản mô tả này có thể là chất liệu sinh học bất kỳ bao gồm chất liệu sinh học chưa được xử lý chứa protein I2S tái tổ hợp. Ví dụ, chế phẩm không tinh khiết có thể là môi trường nuôi cấy tế bào chưa được xử lý chứa protein I2S tái tổ hợp được tiết ra từ các tế bào (ví dụ, tế bào của động vật có vú) tạo ra protein I2S hoặc dịch phân giải tế bào thô chứa protein I2S. Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết có thể là môi trường tế bào hoặc dịch phân giải tế bào đã được xử lý một phần. Ví dụ, môi trường tế bào hoặc dịch phân giải tế bào có thể được làm đặc, được pha loãng, xử lý bằng cách làm bất hoạt virus, xử lý virus hoặc loại bỏ virus. Theo một số phương án, việc loại bỏ virus có thể áp dụng các kỹ thuật lọc cỡ nano và/hoặc sắc ký, trong số các kỹ thuật khác. Theo một số phương án, việc làm bất hoạt virus có thể áp dụng cách làm bất hoạt bằng dung môi, cách làm bất hoạt bằng chất tẩy rửa, cách thanh trùng, cách làm bất hoạt bằng độ pH axit, và/hoặc cách làm bất hoạt bằng tia cực tím, trong số các cách khác. Môi trường tế bào hoặc dịch phân giải tế bào còn có thể được xử lý bằng proteaza, DNaza, và/hoặc RNaza để làm giảm nồng độ của protein tế bào chủ và/hoặc axit nucleic (ví dụ, ADN hoặc ARN). Theo một số phương án, các chất liệu sinh học chưa được xử lý hoặc đã được xử lý một phần (ví dụ, môi trường tế bào hoặc dịch phân giải tế bào) có thể được làm đông lạnh và bảo quản ở nhiệt độ mong muốn (ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C, -4°C, -25°C, -75°C) trong một thời gian và sau đó rã đông để tinh chế. Chế phẩm không tinh khiết được dùng trong bản mô tả này còn được gọi là nguyên liệu ban đầu hoặc nguyên liệu nạp.

Sắc ký trao đổi ion

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế I2S tái tổ hợp bao gồm sắc ký trao đổi anion. Một cách vắn tắt, sắc ký trao đổi anion là kỹ thuật sắc ký mà dựa vào các tương tác điện tích–điện tích giữa hợp chất tích điện âm và nhựa tích điện dương. Theo một số phương án, sắc ký trao đổi anion là sắc ký trao đổi anion

manh. Theo một số phương án, sắc ký trao đổi anion được áp dụng làm bước tinh chế thứ nhất cho protein có hoạt tính điều trị (ví dụ, I2S tái tổ hợp).

Nhựa trao đổi anion làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhựa amin bậc bốn hoặc “nhựa-Q” (ví dụ, Capto™-Q, Q-Sepharose®, QAE Sephadex®); nhựa diethylaminoetan (DEAE) (ví dụ, DEAE-Trisacryl®, DEAE Sepharose®, DEAE naphthoyl benzoyl hóa, diethylaminoethyl Sephacel®); nhựa Amberjet®; nhựa Amberlyst®; nhựa Amberlite® (ví dụ, Amberlite® IRA-67, Amberlite® kiểm mạnh, Amberlite® kiểm yếu), nhựa cholestyramin, nhựa ProPac® (ví dụ, ProPac® SAX-10, ProPac® WAX-10, ProPac® WCX-10); nhựa TSK-GEL® (ví dụ, TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); và nhựa Acclaim®. Theo các phương án nhất định, nhựa trao đổi anion là nhựa Q.

Pha động thông thường đối với sắc ký trao đổi anion bao gồm dung dịch tương đối phân cực như nước, axetonitril, rượu hữu cơ như metanol, etanol, và isopropanol, hoặc dung dịch chứa axit 2-(N-morpholino)-etansulfonic (MES). Do đó, theo các phương án nhất định, pha động chứa khoảng 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%, hoặc khoảng 100% dung dịch phân cực. Theo các phương án nhất định, pha động chứa khoảng từ 1% đến 100%, nằm trong khoảng từ 5% đến 95%, khoảng 10% đến 90%, khoảng 20% đến 80%, nằm trong khoảng từ 30% đến 70%, hoặc khoảng từ 40% đến 60% dung dịch phân cực tại thời điểm bất kỳ trong quá trình tách.

Nói chung, pha động chứa muối. Ví dụ, muối (ví dụ, natri clorua) có thể rửa giải protein liên kết ra khỏi cột trao đổi anion (ví dụ, ion trái dấu là clorua và có thể trao đổi với protein đích, mà sau đó được giải phóng). Theo một số phương án, pha động chứa muối ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0M đến 1,0M, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,8M, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,6M, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,5M, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,4M, nằm trong khoảng từ 0,05M đến 0,50M, nằm trong khoảng từ 0,10M đến 0,45M, nằm trong khoảng từ 0,10M đến 0,40M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,15M đến 0,40M. Theo một số phương án, pha động chứa muối ở nồng độ khoảng 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, hoặc 1,0M. Theo

một số phương án, nồng độ muối trong pha động là gradien (ví dụ, gradien tuyến tính hoặc gradien phi tuyến tính). Theo một số phương án, nồng độ muối trong pha động là không đổi. Theo một số phương án, nồng độ muối trong pha động có thể tăng hoặc giảm từng bước.

Nói chung, pha động được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động không được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 14. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH khoảng bằng 6,5. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH khoảng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, hoặc 10.

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ pH khoảng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 hoặc 7,5 và độ dẫn điện khoảng 2mS/cm, 4mS/cm, 6mS/cm, 8mS/cm, 10mS/cm, 12mS/cm, 14mS/cm, 16mS/cm, 18mS/cm, hoặc 20mS/cm trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi anion (ví dụ, cột Q). Độ pH có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng natri axetat (ví dụ, 1M) và độ dẫn điện có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng natri clorua (ví dụ, 5M). Khi đã được nạp, cột sắc ký trao đổi anion có thể được rửa bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa chứa muối (ví dụ, NaCl) với nồng độ nằm trong khoảng từ 140mM đến 200mM (ví dụ, khoảng 140mM, 145mM, 150mM, 155mM, 160mM, 165mM, 170mM, 175mM, 180mM, 185mM, 190mM, 195mM, hoặc 200mM) với độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,5 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 hoặc 7,5). Cột sắc ký trao đổi anion có thể được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải chứa NaCl với gradien tuyến tính. Gradien NaCl tuyến tính thích hợp làm ví dụ có thể chứa NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0mM đến 500mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 0mM đến 400mM, nằm trong khoảng từ 0mM đến 350mM, nằm trong khoảng từ 0mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 50mM đến 500mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến 500mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến 450mM, nằm trong khoảng từ 150mM đến 400mM).

Sắc ký trao đổi cation

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế tái tổ hợp I2S bao gồm sắc ký trao đổi cation. Một cách vắn tắt, sắc ký trao đổi cation là kỹ thuật sắc ký mà dựa vào các tương tác điện tích–điện tích giữa hợp chất tích điện dương và nhựa tích điện âm. Theo một số phương án, sắc ký trao đổi cation là sắc ký trao đổi cation mạnh.

Sắc ký trao đổi cation thường được thực hiện bằng cột trao đổi cation mạnh hoặc yếu, chứa ion sulfoni, hoặc bằng hệ trao đổi cation yếu, thường có nhóm chức carboxymetyl (CM) hoặc carboxylat (CX). Nhiều nhựa trao đổi cation thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể mua được trên thị trường và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SP-Sepharose[®], CM Sepharose[®]; nhựa Amberjet[®]; nhựa Amberlyst[®]; nhựa Amberlite[®] (ví dụ, Amberlite[®] IRA120); nhựa ProPac[®] (ví dụ, ProPac[®] SCX-10, ProPac[®] WCX-10, ProPac[®] WCX-10); nhựa TSK-GEL[®] (ví dụ, 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, và TSKgel CM-STAT); và nhựa Acclaim[®]. Theo các phương án nhất định, nhựa trao đổi anion là nhựa SP-Sepharose[®].

Pha động tiêu biểu cho sắc ký trao đổi cation bao gồm dung dịch tương đối phân cực, như nước, axetonitril, rượu hữu cơ như metanol, etanol, và isopropanol, hoặc dung dịch chứa axit 2-(N-morpholino)-etansulfonic (MES). Do đó, theo các phương án nhất định, pha động bao gồm khoảng 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%, hoặc khoảng 100% dung dịch phân cực. Theo các phương án nhất định, pha động chứa dung dịch phân cực với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 100%, nằm trong khoảng từ 5% đến 95%, nằm trong khoảng từ 10% đến 90%, nằm trong khoảng 20% đến 80%, nằm trong khoảng từ 30% đến 70%, hoặc khoảng từ 40% đến 60% tại thời điểm bất kỳ trong quá trình tách.

Nói chung, pha động chứa muối. Ví dụ, muối (ví dụ, natri clorua, natri phosphat, v.v.) có thể rửa giải protein liên kết ra khỏi cột trao đổi cation (ví dụ, ion trái dấu là natri và có thể trao đổi với protein đích, mà sau đó, được giải phóng). Theo một số phương án, pha động chứa muối với nồng độ nằm trong khoảng từ 0M đến 1,0M, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,8M, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,6M, nằm trong

khoảng từ 0M đến 0,5M, nằm trong khoảng từ 0M đến 0,4M, nằm trong khoảng từ 0,05M đến 0,50M, nằm trong khoảng từ 0,10M đến 0,45M, nằm trong khoảng từ 0,10M đến 0,40M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,15M đến 0,40M. Theo một số phương án, pha động bao gồm muối với nồng độ khoảng 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, hoặc 1,0M. Theo một số phương án, nồng độ muối trong pha động là gradient (ví dụ, gradient tuyến tính hoặc phi tuyến tính). Theo một số phương án, nồng độ muối trong pha động là không đổi. Theo một số phương án, nồng độ muối trong pha động có thể làm tăng hoặc làm giảm từng bước.

Nói chung, pha động được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động không được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 14. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH khoảng bằng 6,5. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH khoảng bằng 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, hoặc 10.

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 20mS/cm (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1mS/cm và 15mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm và 10mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 8mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 6mS/cm, nằm trong khoảng từ 1mS/cm đến 4mS/cm, nằm trong khoảng từ 2mS/cm và 4mS/cm) trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP). Theo các phương án cụ thể, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến độ dẫn điện nằm trong khoảng từ khoảng 2mS/cm đến 4mS/cm (ví dụ, 2mS/cm, 2,5mS/cm, 3mS/cm, 3,5 mS/cm, hoặc 4mS/cm) trước khi nạp vào cột sắc ký trao đổi cation (ví dụ, cột SP). Độ dẫn điện có thể được điều chỉnh bằng cách pha loãng chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng bằng với tỷ lệ, ví dụ, 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, hoặc 10:1. Độ dẫn điện còn có thể được điều chỉnh bằng cách lọc thẩm tách vào dung dịch đệm mong muốn. Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi cation được chạy ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, khoảng

5,0, 5,5, 6,0 hoặc 6,5). Theo một số phương án, cột sắc ký trao đổi cation được bằng dung dịch đệm chứa phosphat (ví dụ, NaPO_4) với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01M đến 0,1M (ví dụ, khoảng 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M, 0,05M, 0,06M, 0,07M, 0,08M, 0,09M, hoặc 0,1M). Theo một số phương án, độ pH thích hợp là khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, nằm trong khoảng từ 5,0, 5,5, 6,0, hoặc 6,5).

Sắc ký kiểu hỗn hợp

Sắc ký hydroxyapatit (HA) được xem là sắc ký trao đổi ion “giả ái lực” hoặc “kiểu phối hợp” và có thể được áp dụng theo sáng chế. Hydroxyapatit là dạng canxi phosphat duy nhất được dùng để phân đoạn và tinh chế các phân tử sinh học. Trong một số trường hợp, tinh thể hydroxyapatit có thể được sử dụng, mặc dù sự mỏng manh của các tinh thể này có thể hạn chế tốc độ dòng và/hoặc độ bền của cột. Hai kiểu hydroxyapatit gồm tinh khiết về mặt hóa học, hydroxyapatit gồm CHT kiểu I và II có dạng xốp, hình cầu và có thể được sử dụng trong điều kiện tốc độ dòng và áp suất cao. Kiểu I thường có khả năng liên kết với protein cao, trong khi Kiểu II thường có khả năng liên kết thấp với protein. Nói chung, công thức hydroxyapatit là $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kawasaki, et al 1985). Các nhóm chức bao gồm cặp ion canxi tinh thể tích điện dương (vị trí C) và các cụm gồm sáu nguyên tử oxy tích điện âm kết hợp với bộ ba phosphat tinh thể (vị trí P). Các vị trí C, P và hydroxyl được phân phối theo kiểu hình cố định trên bề mặt tinh thể, thường dẫn đến các tương tác phức với protein và các phân tử khác.

Mẫu có thể được nạp vào cột HA trong dung dịch đệm cường độ ion phosphat thấp (ví dụ, natri hoặc kali phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 1mM đến 10mM) ở độ pH trung tính hoặc gần độ pH trung tính. Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng chảy qua được điều chỉnh đến nồng độ phosphat (ví dụ, NaPO_4) nằm trong khoảng từ 0,001M đến 0,01M (ví dụ, khoảng 0,001M, 0,002M, 0,003M, 0,004M, 0,005M, 0,006M, 0,007M, 0,008M, 0,009M, hoặc 0,01M) và độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 (ví dụ, khoảng 5,0, 5,5, 6,0, hoặc 6,5) trước khi nạp vào cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA). Cột HA đã nạp thường được rửa bằng dung dịch đệm rửa có nồng độ phosphat tương đương với nồng độ phosphat của dung dịch đệm nạp. Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA), khi đã được nạp, rửa bằng dung dịch đệm rửa

chứa phosphat (ví dụ, natri hoặc kali phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 1mM đến 10mM) ở độ pH trung tính hoặc gần độ pH trung tính. Ví dụ, dung dịch đệm rửa thích hợp có thể có nồng độ phosphat khoảng 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, hoặc 10mM. Theo một số phương án, có thể mong muốn để tăng lượng phosphat trong dung dịch đệm rửa để tạo ra điều kiện rửa nghiêm ngặt hơn. Các mức M6P, cụ thể là mức di-M6P, trên bề mặt của protein I2S được dự tính là quan trọng để hướng đích đến thể tiêu bào. Nồng độ phosphat tăng trong dung dịch đệm rửa có thể giữ lại một cách chọn lọc các protein I2S ở mức M6P cao, cụ thể là, di-M6P trên cột HA. Do đó, theo một số phương án, dung dịch đệm rửa mong muốn có thể có nồng độ phosphat bằng hoặc cao hơn 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM, 15mM, 16mM, 17mM, 18mM, 19mM, 20mM. Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp đã nạp (ví dụ, cột HA) được rửa bằng dung dịch đệm rửa có nồng độ phosphat nằm trong khoảng từ 10mM đến 20mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 10mM đến 18mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 16mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 15mM, nằm trong khoảng từ 12mM đến 20mM, nằm trong khoảng từ 14mM đến 18mM, nằm trong khoảng từ 14mM đến 16mM). Theo một số phương án, cột sắc ký kiểu hỗn hợp đã nạp (ví dụ, cột HA) được rửa bằng dung dịch đệm rửa có nồng độ phosphat bằng cao hơn 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM, 15mM, 16mM, 17mM, 18mM, 19mM, 20mM.

Việc rửa giải ra khỏi cột HA thường được thực hiện bằng dung dịch đệm phosphat gradien. Ví dụ, dung dịch đệm rửa giải thích hợp có thể có gradien phosphat nằm trong khoảng từ 1mM đến 400mM (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 150mM, nằm trong khoảng từ 1mM đến 100mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 350mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 250mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 150mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 140mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 130mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 120mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 110mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 100mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 90mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 80mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 70mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến 60mM, nằm trong khoảng từ 10mM đến

50mM) natri phosphat. Theo một số phương án, việc rửa giải ra khỏi cột HA được thực hiện bằng cách làm tăng từng bước nồng độ phosphat trong dung dịch đệm rửa giải. Theo một số phương án, các dung dịch đệm rửa giải từng bước có thể có nồng độ phosphat được chọn từ 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 110mM, 120mM, 130mM, 140mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM. Theo một số phương án, việc rửa giải ra khỏi cột sắc ký kiểu hỗn hợp (ví dụ, cột HA) được thực hiện bằng cách rửa giải dung dịch đệm có nồng độ phosphat (ví dụ, natri phosphat) nằm trong khoảng từ 50mM đến 150mM (ví dụ, chọn trong số nồng độ phosphat (ví dụ, natri phosphat) khoảng 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 110mM, 120mM, 130mM, 140mM, 150mM, và các cách kết hợp của chúng).

Có thể thấy rằng nhiều cách khác nhau để kết hợp các điều kiện sắc ký HA đã được biết và có thể được áp dụng để điều chỉnh các thông số đến thích hợp đối với protein cụ thể đáng quan tâm (ví dụ, I2S tái tổ hợp).

Sắc ký tương tác kỵ nước

Sắc ký tương tác kỵ nước (Hydrophobic Interaction Chromatography -HIC) là kỹ thuật tách sử dụng các tính chất kỵ nước để tách các protein ra khỏi nhau. Theo kiểu sắc ký này, các nhóm kỵ nước như phenyl, octyl, hoặc butyl, được gắn vào cột tĩnh. Các protein đi qua cột mà có mạch bên là axit amin kỵ nước trên bề mặt của chúng cũng có thể tương tác với và liên kết với các nhóm kỵ nước trên cột. Cột HIC là đã biết, và bao gồm, ví dụ, Phenyl Sepharose.

Phép tách HIC thường được thiết kế bằng cách sử dụng điều kiện trái ngược với các điều kiện được dùng trong trao đổi ion sắc ký. Nói chung, dung dịch đệm có cường độ ion cao, thường là amoni sulfat, ban đầu được đưa lên cột. Muối trong dung dịch đệm sẽ làm giảm mức độ solvat hóa của chất tan mẫu khi mức độ solvat hóa làm giảm, các vùng kỵ nước bị bộc lộ sẽ được môi trường hấp thụ. Pha tĩnh thường được thiết kế để tạo ra tương tác kỵ nước với các phân tử khác. Các tương tác này thường quá yếu trong nước, tuy nhiên, việc bổ sung muối (ví dụ, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , và NaSCN) vào dung dịch đệm dẫn đến tương tác kỵ nước. Theo một số phương án, pha động chứa muối ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1M đến

3,0M, ví dụ, nằm trong khoảng từ <5M đến 1,5M, nằm trong khoảng từ 0,2M đến 0,8M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,3M đến 0,5M.

Theo các phương án nhất định, pha động được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động không được đệm. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 14. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7. Theo các phương án nhất định, pha động được đệm đến độ pH khoảng bằng 5,0.

Theo một số phương án, chế phẩm không tinh khiết hoặc chất rửa giải trung gian hoặc lưu lượng được điều chỉnh đến nồng độ muối (ví dụ, NaCl) nằm trong khoảng từ 0,5M đến 2,0M (ví dụ, khoảng 0,5M, 1,0M, 1,1M, 1,2M, 1,3M, 1,4M, 1,5M, 1,6M, 1,7M, 1,8M, 1,9M, hoặc 2,0M) ở độ pH) nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0) trước khi nạp lên cột sắc ký tương tác kỵ nước (ví dụ, cột phenyl). Khi đã được nạp, cột sắc ký tương tác kỵ nước có thể được rửa bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa chứa muối (ví dụ, NaCl) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5M đến 2,0M (ví dụ, khoảng 0,5M, 1,0M, 1,1M, 1,2M, 1,3M, 1,4M, 1,5M, 1,6M, 1,7M, 1,8M, 1,9M, hoặc 2,0M) ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0). Theo một số phương án, cột sắc ký tương tác kỵ nước được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải chứa muối (ví dụ, NaCl) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1M đến 0,5M (ví dụ, khoảng 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, hoặc 0,5M) ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 (ví dụ, khoảng 4,5, 5,0, 5,5, hoặc 6,0).

Xác định tính chất của protein I2S đã được tinh chế

Protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được xác định tính chất bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau.

Độ tinh khiết

Độ tinh khiết của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế thường được đo theo nồng độ của các tạp chất khác nhau (ví dụ, protein của tế bào chủ hoặc ADN của tế bào chủ) có mặt trong sản phẩm cuối cùng. Ví dụ, nồng độ của protein của tế bào chủ (HCP) có thể được đo theo phương pháp ELISA hoặc SDS-PAGE. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế chứa protein I2S ở nồng độ ít hơn

150ng HCP/mg (ví dụ, protein I2S ở nồng độ ít hơn 140ng, 130ng, 120ng, 110ng, 100ng, 90ng, 80ng, 70ng, 60ng, 50ng, 40ng, 30ng, 30ng, 20ng, 10ng HCP/mg). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế, khi được phân tích theo SDS-PAGE kèm theo nhuộm bạc, không có dải mới có cường độ mạnh hơn 0,05%, 0,01%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, hoặc 0,5% đối chứng thử nghiệm. Các đối chứng thử nghiệm khác nhau có thể được sử dụng, cụ thể là, các đối chứng đã được các cơ quan quản lý, như Cục Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (FDA), chấp nhận.

Hoạt tính đặc hiệu

Protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế còn có thể được xác định tính chất bằng cách đánh giá chức năng và/hoặc hoạt tính sinh học. Hoạt tính enzym của chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các phương pháp này phát hiện sự loại bỏ sulfat ra khỏi cơ chất tổng hợp, mà được gọi là thử nghiệm giải phóng sulphat. Một ví dụ về thử nghiệm hoạt tính enzym bao gồm việc áp dụng sắc ký ion. Phương pháp này định lượng ion sulfat mà đã được giải phóng nhờ enzym bằng I2S tái tổ hợp từ cơ chất. Cơ chất này có thể là cơ chất tự nhiên hoặc cơ chất tổng hợp. Trong một số trường hợp, cơ chất là heparin sulfat (ví dụ, heparin disacarit), dermatan sulfat, hoặc dạng tương đương về mặt chức năng của chúng. Nói chung, ion sulfat giải phóng được phân tích theo phương pháp sắc ký ion với bộ dò độ dẫn điện. Trong ví dụ này, các kết quả có thể được biểu hiện theo U/mg protein, trong đó 1 đơn vị (unit – U) được xác định là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μ mol ion sulfat trong thời gian mỗi giờ ra khỏi cơ chất. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có hoạt tính đặc hiệu, như đo được theo thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 10U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 10U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 20 đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 70U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 60U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 90U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 70U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 60U/mg, nằm trong

khoảng từ 40U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 90U/mg, khoảng 40U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 70U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 60U/mg. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có hoạt tính đặc hiệu, như đo được theo thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin đisacarit làm cơ chất, ít nhất khoảng 5U/mg, khoảng 10U/mg, khoảng 15U/mg, khoảng 20U/mg, khoảng 25U/mg, khoảng 30U/mg, khoảng 35U/mg, khoảng 40U/mg, khoảng 45U/mg, khoảng 50U/mg, khoảng 55U/mg, khoảng 60U/mg, khoảng 65U/mg, khoảng 70U/mg, khoảng 75U/mg, khoảng 80U/mg, khoảng 85U/mg, khoảng 90U/mg, khoảng 95U/mg, hoặc khoảng 100U/mg. Điều kiện làm ví dụ để thực hiện thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin đisacarit làm cơ chất được nêu dưới đây. Nói chung, thử nghiệm này đo khả năng của I2S để giải phóng các ion sulfat từ chất có nguồn gốc tự nhiên, heparin đisacarit. Sulfat giải phóng có thể được định lượng bằng sắc ký ion. Trong một số trường hợp, sắc ký ion có lắp bộ dò độ dẫn điện. Để làm ví dụ không giới hạn, đầu tiên, các mẫu được trao đổi dung dịch đệm thành Na axetat 10mM, độ pH = 6 để loại bỏ sự ức chế do ion phosphat trong chế phẩm dung dịch đệm. Sau đó, các mẫu được pha đến 0,075mg/ml bằng dung dịch đệm phản ứng (Na axetat 10mM, độ pH=4,4) và ủ trong thời gian 2 giờ ở 37°C với heparin ở tỷ lệ enzym với cơ chất là 0,3µg I2S/100µg cơ chất trong 30µl thể tích phản ứng. Sau đó, phản ứng bị ngừng bằng cách làm nóng mẫu ở 100°C trong thời gian 3 phút. Phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng cột phân tích Dionex IonPac AS18 với cột bảo vệ IonPac AG18. Phương pháp đẳng dung môi được áp dụng với kali hydroxit 30mM với lưu tốc 1,0ml/phút trong thời gian 15 phút. Lượng sulfat giải phóng bởi mẫu I2S tính được từ phân tích hồi quy tuyến tính chất chuẩn sulfat trong khoảng từ 1,7nmol đến 16,0nmol. Trị số có thể thông báo được biểu hiện theo đơn vị trên mỗi mg protein, trong đó 1 đơn vị được xác định là 1µmol sulfat giải trong thời gian mỗi giờ và nồng độ protein được xác định theo phép đo A280.

Theo một số phương án, hoạt tính enzym của protein I2S tái tổ hợp còn có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết khác trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, thử nghiệm 4-MUF đo mức độ thủy phân 4-metylbeliferyl-sulfat thành sulfat và 4-metylbeliferon huỳnh quang tự nhiên (4-MUF). Theo một

số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được theo thử nghiệm 4-MUF *in vitro*, của protein I2S tái tổ hợp được tạo ra ít nhất là khoảng 0,5U/mg, 1,0U/mg, 1,5U/mg, 2U/mg, 2,5U/mg, 3U/mg, 4U/mg, 5U/mg, 6U/mg, 7U/mg, 8U/mg, 9U/mg, 10U/mg, 12U/mg, 14U/mg, 16U/mg, 18U/mg, hoặc 20U/mg. Theo một số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được nhờ thử nghiệm 4-MUF *in vitro*, của protein I2S tái tổ hợp tạo ra nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 50U/mg (ví dụ, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 10U/mg). Điều kiện làm ví dụ để thực hiện 4 thử nghiệm -MUF *in vitro* được nêu dưới đây. Nói chung, thử nghiệm 4-MUF đo khả năng của protein I2S trong việc thủy phân 4-metylbelferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành sulfat và 4-metylbelferon huỳnh quang tự nhiên (4-MUF). Một mili đơn vị hoạt tính được xác định là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa một nanomol 4-MUF-SO₄ thành 4-MUF trong thời gian một phút ở 37°C. Nói chung, đơn vị huỳnh quang trung bình (MFU) đã được tạo ra bởi mẫu thử nghiệm I2S có hoạt tính đã biết có thể được dùng để tạo ra đường cong chuẩn, mà có thể được dùng để tính hoạt tính enzym của mẫu quan tâm. Sau đó, hoạt tính đặc hiệu của có thể được tính bằng cách lấy hoạt tính enzym chia cho nồng độ protein.

Theo ví dụ khác, nồng độ protein của chế phẩm I2S tái tổ hợp có thể được xác định theo phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định nồng độ protein. Trong một số trường hợp, nồng độ protein được xác định theo thử nghiệm hấp thụ tia cực tím. Các thử nghiệm hấp thụ này thường được thực hiện ở khoảng bước sóng 280nm (A₂₈₀).

Biên dạng điện tích

I2S tái tổ hợp tinh chế có thể được xác định tính chất theo biên dạng điện tích liên quan đến protein. Nói chung, biên dạng điện tích của protein phản ánh kiểu hình của điện tích của gốc mạch bên, thường có mặt trên bề mặt protein. Biên dạng điện tích có thể được xác định bằng cách thực hiện thử nghiệm sắc ký trao đổi ion (IEX) (ví dụ, sắc ký lỏng cao áp) trên protein. Theo một số phương án, “biên dạng điện tích” chỉ tập hợp các trị số thể hiện lượng protein rửa giải từ cột trao đổi ion tại một thời điểm sau khi bổ sung pha động chứa ion trao đổi vào cột.

Nói chung, cột trao đổi ion thích hợp là cột trao đổi anion. Ví dụ, biên dạng điện tích có thể được xác định bằng sắc ký trao đổi anion mạnh (strong anion exchange – SAX) bằng cách sử dụng hệ sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Nói chung, I2S tái tổ hợp hấp thu lên điện tích dương cố định của cột trao đổi anion mạnh và gradien cường độ ion tăng dần bằng cách sử dụng pha động với tốc độ dòng được xác định trước sẽ rửa giải các loại I2S tái tổ hợp ra khỏi cột theo tỷ lệ với cường độ tương tác ion của chúng với cột tích điện dương. Các loại I2S tích điện âm nhiều hơn (axit hơn) sẽ rửa giải muộn hơn các loại I2S tích điện âm ít hơn (kém axit hơn). Nồng độ của các protein trong dịch rửa giải được đo theo mức độ hấp thu ánh sáng tia cực tím (ở bước sóng 280nm).

Theo một số phương án, ở độ pH khoảng 8,0 trong Tris-HCl 20mM, I2S tái tổ hợp hấp thu lên điện tích dương cố định của cột Mini Q PE và gradien cường độ ion tăng dần bằng cách sử dụng pha động chứa Tris-HCL 20mM, natri clorua 1M, độ pH 8,0 với tốc độ dòng 0,8ml/phút sẽ rửa giải các loại tái tổ hợp ra khỏi cột theo tỷ lệ với cường độ tương tác ion của chúng với cột tích điện dương.

Theo một số phương án, biên dạng điện tích có thể được thể hiện bởi sắc phổ mức độ hấp thu theo thời gian sau khi rửa giải ra khỏi cột sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Sắc phổ này có thể bao gồm một tập hợp gồm một hoặc nhiều đỉnh, trong đó mỗi đỉnh trong tập hợp này xác định một tiểu quần thể I2S tái tổ hợp của chế phẩm mà có điện tích bề mặt tương tự.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein I2S đã được tinh chế thể hiện ít nhất sáu đỉnh trong biên dạng điện tích của nó. Biên dạng điện tích làm ví dụ của I2S được thể hiện trong phần ví dụ và trên Hình 11. Như được thể hiện trên Hình 11, sáu đỉnh được đánh dấu (từ A đến F) theo thứ tự của điện tích âm tăng dần và mức độ ảnh hưởng đến tổng diện tích đỉnh của sắc phổ này giảm dần. Theo một số phương án,

biên dạng điện tích đối với chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có số lượng, kích thước, hình dạng hoặc khoảng cách thời gian của các đỉnh khác nhau tùy theo lượng điện tích âm hoặc dương trên bề mặt của protein. Theo một số phương án, chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp có biên dạng điện tích ít hơn 6 (ví dụ, nhỏ hơn 5, 4, 3, hoặc 2) đỉnh. Theo một số phương án, biên dạng điện tích chứa I2S tái tổ hợp có thể có 5, 4, 3, 2, hoặc 1 đỉnh. Ví dụ, một, hai, ba, bốn, hoặc năm đỉnh bất kỳ trong các đỉnh A, B, C, D, E, và F có thể không có mặt hoặc bị giảm trong chế phẩm chứa protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế. Nói chung, biên dạng điện tích được coi là đồng nhất nếu có ít đỉnh hơn.

Lập bản đồ glycan

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được xác định tính chất theo thành phần proteoglycan của chúng, thường được gọi là lập bản đồ glycan. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, nhận thấy rằng liên kết glycan cũng như hình dạng và độ phức tạp của cấu trúc nhánh có thể ảnh hưởng đến độ thanh thải *in vivo*, sự hướng đích đến thể tiêu bào, độ sinh khả dụng, và/hoặc hiệu quả.

Nói chung, bản đồ glycan có thể được xác định bằng cách phân cắt nhờ enzym và tiếp theo là phân tích sắc ký. Các enzym khác nhau có thể được sử dụng để phân cắt enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các enzyme glycosylaza, peptidaza (ví dụ, endopeptidaza, exopeptidaza), proteaza, và phosphataza thích hợp. Theo một số phương án, enzym thích hợp là phosphataza kiềm. Theo một số phương án, enzym thích hợp là neuraminidaza. Glycan (ví dụ, phosphoglycan) có thể được phát hiện bằng phân tích sắc ký. Ví dụ, phosphoglycan có thể là được phát hiện bằng sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với bộ dò xung điện (HPAE-PAD) hoặc phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) loại trừ theo kích thước. Lượng glycan (ví dụ, phosphoglycan) được thể hiện bằng mỗi đỉnh trên bản đồ glycan có thể được tính bằng cách sử dụng đường cong glycan (ví dụ, phosphoglycan) chuẩn, theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, I2S đã được tinh chế theo sáng chế thể hiện bản đồ glycan gồm bảy nhóm đỉnh lần lượt là dấu hiệu chỉ báo về protein I2S trung tính (nhóm đỉnh 1), protein I2S đã được mono-sialyl hóa (nhóm đỉnh 2), protein I2S đã được di-sialyl hóa (nhóm đỉnh 3), protein I2S đã được mono-phosphoryl hóa (nhóm

đỉnh 4), protein I2S đã được tri-sialyl hóa (nhóm đỉnh 5), protein I2S đã được tetra-sialyl hóa (nhóm đỉnh 6), và protein I2S đã được diphosphoryl hóa (nhóm đỉnh 7). Bản đồ glycan của I2S làm ví dụ được thể hiện trên Hình 10. Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có bản đồ glycan gồm ít hơn 7 nhóm đỉnh (ví dụ, bản đồ glycan có 6, 5, 4, 3, hoặc 2 Nhóm đỉnh). Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có bản đồ glycan gồm nhiều hơn 7 nhóm đỉnh (ví dụ, 8, 9, 10, 11, 12 hoặc nhiều hơn).

Lượng glycan tương đối tương ứng với mỗi nhóm đỉnh có thể được xác định trên cơ sở diện tích nhóm đỉnh so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng trong chất chuẩn tham chiếu được xác định trước. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 1 (trung tính) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 40% đến 120% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 40% đến 115%, nằm trong khoảng từ 40% đến 110%, nằm trong khoảng từ 40% đến 100%, nằm trong khoảng từ 45% đến 120%, nằm trong khoảng từ 45% đến 115%, nằm trong khoảng từ 45% đến 110%, nằm trong khoảng từ 45% đến 105%, nằm trong khoảng từ 45% đến 100%, nằm trong khoảng từ 50% đến 120%, nằm trong khoảng từ 50% đến 110%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 2 (monosialyl hóa) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 80% đến 140% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 80% đến 135%, nằm trong khoảng từ 80% đến 130%, nằm trong khoảng từ 80% đến 125%, nằm trong khoảng từ 90% đến 140%, nằm trong khoảng từ 90% đến 135%, nằm trong khoảng từ 90% đến 130%, nằm trong khoảng từ 90% đến 120%, nằm trong khoảng từ 100% đến 140%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 3 (disialyl hóa) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 80% đến 110% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 80% đến 105%, nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, nằm trong khoảng từ 85% đến 105%, nằm trong khoảng từ 85% đến 100%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 4 (mono phosphoryl hóa) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 100% đến 550% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 100% đến 525%, nằm trong khoảng từ 100% đến 500%, nằm trong khoảng từ 100% đến 450%, nằm trong khoảng từ 150% đến 550%, nằm trong khoảng từ 150% đến 500%, khoảng 150% đến 450%, nằm trong khoảng từ 200% đến 550%, nằm trong khoảng từ 200% đến 500%,

nằm trong khoảng từ 200% đến 450%, nằm trong khoảng từ 250% đến 550%, nằm trong khoảng từ 250% đến 500%, nằm trong khoảng từ 250% đến 450%, hoặc nằm trong khoảng từ 250% đến 400%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 5 (tri-sialyl hóa) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 70% đến 110% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 70 đến 105%, nằm trong khoảng từ 70% đến 100%, nằm trong khoảng từ 70% đến 95%, nằm trong khoảng từ 70% đến 90%, nằm trong khoảng từ 80% đến 110%, nằm trong khoảng từ 80% đến 105%, nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, hoặc nằm trong khoảng từ 80% đến 95%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 6 (tetra-sialyl hóa) có thể có diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 90% đến 130% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 90% đến 125%, nằm trong khoảng từ 90% đến 120%, nằm trong khoảng từ 90% đến 115%, nằm trong khoảng từ 90% đến 110%, nằm trong khoảng từ 100% đến 130%, nằm trong khoảng từ 100% đến 125%, hoặc nằm trong khoảng từ 100% đến 120%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Theo một số phương án, nhóm đỉnh 7 (diphosphoryl hóa) có thể có với diện tích nhóm đỉnh nằm trong khoảng từ 70% đến 130% (ví dụ, nằm trong khoảng từ 70% đến 125%, nằm trong khoảng từ 70% đến 120%, nằm trong khoảng từ 70% đến 115%, nằm trong khoảng từ 70% đến 110%, nằm trong khoảng từ 80% đến 130%, nằm trong khoảng từ 80% đến 125%, nằm trong khoảng từ 80% đến 120%, nằm trong khoảng từ 80% đến 115%, nằm trong khoảng từ 80% đến 110%, nằm trong khoảng từ 90% đến 130%, nằm trong khoảng từ 90% đến 125%, nằm trong khoảng từ 90% đến 120%, nằm trong khoảng từ 90% đến 115%, nằm trong khoảng từ 90% đến 110%) so với diện tích nhóm đỉnh tương ứng ở chuẩn tham chiếu. Nhiều chất tham chiếu cho lập bản đồ glycan là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được dùng để thực hiện sáng chế. Nói chung, nhóm đỉnh 7 (diphosphoryl hóa) tương ứng với nồng độ của di-M6P trên bề mặt của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế.

Dự tính rằng kiểu hình glycosyl hóa của I2S đã được tinh chế ảnh hưởng đến sự hướng đích đến thể tiêu bào. Các thử nghiệm hấp thu tế bào *in vitro* khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được áp dụng để thực hiện sáng chế. Ví dụ, để đánh giá mức độ hấp thu I2S của các thụ thể M6P, các thử nghiệm hấp thu tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng nguyên bào sợi của người biểu hiện các thụ thể

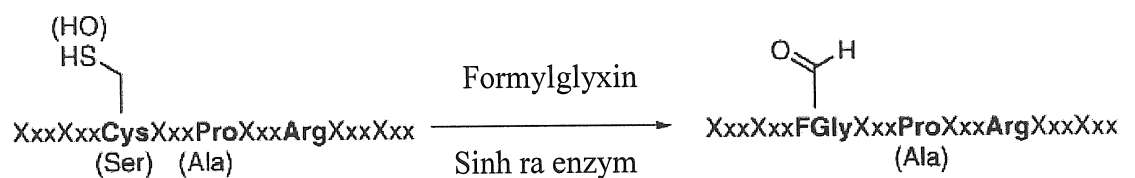
M6P trên bề mặt của chúng. Lượng I2S nhập bào có thể được đo theo phương pháp ELISA. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế theo sáng chế được xác định theo mức độ hấp thu tế bào lớn hơn 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, như xác định được theo thử nghiệm hấp thu *in vitro*.

Lập bản đồ peptit

Theo một số phương án, việc lập bản đồ peptit có thể được dùng để xác định đặc điểm của thành phần axit amin, cải biến sau dịch mã, và/hoặc việc xử lý tế bào; như mức độ phân cắt trình tự dẫn truyền tín hiệu peptit, chuyển hóa formylglyxin và/hoặc glycosyl hóa. Nói chung, protein tái tổ hợp có thể bị phá vỡ thành các đoạn peptit riêng biệt, thông qua việc phá vỡ có kiểm soát hoặc ngẫu nhiên, để tạo ra kiểu hình hoặc bản đồ peptit. Trong một số trường hợp, đầu tiên, protein I2S đã được tinh chế có thể được phân cắt enzym trước khi phân tích. Việc phân cắt có thể được thực hiện bằng cách sử dụng peptidaza, glycosit hydrolaza, phosphataza, lipaza hoặc proteaza và/hoặc hỗn hợp của chúng, trước khi phân tích. Thành phần cấu trúc của các peptit có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phép đo phổ khối, cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) hoặc sắc ký lỏng cao áp.

Phản trăm chuyển hóa formylglyxin

Việc lập bản đồ peptit có thể được áp dụng để xác định phản trăm chuyển hóa FGly. Như đã nêu trên, việc hoạt hóa I2S cần đến sự chuyển hóa xystein (tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người) thành formylglyxin bằng enzym sinh ra formylglyxin (FGE) như được thể hiện dưới đây:



Do đó, tỷ lệ phần trăm của formylglyxin chuyển hóa (%FG) có thể được tính bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\%FG \text{ (của DS)} = \frac{\text{số lượng phân tử I2S hoạt tính}}{\text{số lượng phân tử I2S toàn phần (hoạt tính + không hoạt tính)}}^X$$

Để tính %FG, protein I2S tái tổ hợp có thể được phân cắt thành các peptit ngắn bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, trypsin hoặc chymotrypsin). Các peptit ngắn có thể được tách và được xác định tính chất bằng cách áp dụng, ví dụ, phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) loại trừ theo kích thước. Peptit chứa vị trí tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người có thể được xác định tính chất để xác định xem Cys ở vị trí 59 có được chuyển hóa thành FGly so với đối chứng (ví dụ, protein I2S mà không chuyển hóa FGly hoặc protein I2S chuyển hóa FGly 100%). Lượng peptit chứa FGly (tương ứng với số lượng phân tử I2S hoạt tính) và tổng lượng peptit có cả FGly và Cys (tương ứng với số lượng toàn phần phân tử I2S) có thể được xác định trên cơ sở diện tích đỉnh tương ứng và tỷ lệ này phản ánh %FG có thể được tính.

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế theo sáng chế có mức độ chuyển hóa ít nhất khoảng 70% (ví dụ, ít nhất khoảng 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) gốc xystein tương ứng với Cys59 của I2S của người (SEQ ID NO:1) thành C α -formylglyxin (FGly). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế theo sáng chế có mức độ chuyển hóa hầu như 100% gốc xystein tương ứng với Cys59 của I2S của người (SEQ ID NO:1) thành C α -formylglyxin (FGly).

Hàm lượng axit sialic

Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được xác định tính chất theo thành phần axit sialic. Không muốn bị ràng buộc bởi một lý thuyết, dự tính rằng gốc axit sialic trên protein có thể ngăn ngừa, làm giảm hoặc ức chế sự thanh thải nhanh của chúng *in vivo* qua các thụ thể asialoglycoprotein mà có mặt trên các tế bào gan. Do đó, nhận thấy rằng các protein tái tổ hợp mà có hàm lượng axit sialic tương đối cao thường có thời gian tuần hoàn *in vivo* tương đối dài.

Theo một số phương án, hàm lượng axit sialic của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, hàm lượng axit sialic của protein I2S tái tổ hợp có thể được xác định bằng cách phân cắt nhờ enzym và tiếp theo là phân tích sắc ký. Việc phân cắt nhờ enzym có thể được thực hiện bằng cách sử dụng sialidaza thích hợp bất kỳ. Trong một số trường hợp, việc phân cắt được thực hiện bằng enzym glycosit hydrolaza, như neuraminidaza. Axit sialic có thể là được phát hiện bằng phân tích sắc ký, ví dụ, sắc

ký trao đổi anion hiệu năng cao với bộ dò xung điện (HPAE-PAD). Lượng axit sialic trong chế phẩm chứa I2S tái tổ hợp có thể được tính bằng cách sử dụng đường cong axit sialic chuẩn, theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, hàm lượng axit sialic của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể là lớn hơn 16mol/mol. Đơn vị “mol/mol” trong phạm vi hàm lượng axit sialic được dùng để chỉ mol gốc axit sialic trên mỗi mol enzym. Trong một số trường hợp, hàm lượng axit sialic của protein I2S tái tổ hợp bằng hoặc lớn hơn khoảng 16,5mol/mol, khoảng 17mol/mol, khoảng 18mol/mol, khoảng 19mol/mol, khoảng 20mol/mol, khoảng 21mol/mol, khoảng 22mol/mol hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, hàm lượng axit sialic của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể là nằm trong khoảng từ 16mol/mol đến 20mol/mol, từ 16mol/mol đến 21mol/mol, nằm trong khoảng từ 16mol/mol đến 22mol/mol, nằm trong khoảng từ 16 đến 23mol/mol, nằm trong khoảng từ 16mol/mol đến 24mol/mol, nằm trong khoảng từ 16mol/mol đến 25mol/mol, nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 20mol/mol, nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 21mol/mol, nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 22mol/mol, nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 23mol/mol, nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 24mol/mol, hoặc nằm trong khoảng từ 17mol/mol đến 25mol/mol.

Dược phẩm và sử dụng

Protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được cho bệnh nhân mắc hội chứng Hunter dùng theo các phương pháp đã biết. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được phân phối qua đường tĩnh mạch, dưới da, bắp, ngoài đường tiêu hóa, qua da, hoặc qua niêm mạc (ví dụ, qua đường miệng hoặc qua đường mũi).

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng qua đường tĩnh mạch.

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng qua đường nội tủy mạc. Các thuật ngữ “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc “tiêm vào nội tủy mạc” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc tiêm vào ống tủy sống (khoảng nội tủy mạc xung quanh tủy sống). Các kỹ thuật khác nhau có thể được áp dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tiêm vào não thất bên thông qua việc khoan lỗ hoặc chọc bể não hoặc thất lưng hoặc tương tự. Theo một số

phương án, việc “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc phân phối nội tủy mạc” theo sáng chế chỉ việc sử dụng IT hoặc phân phối qua khu vực hoặc vùng thất lưng, tức là việc sử dụng hoặc phân phối IT thất lưng. Thuật ngữ “vùng thất lưng” hoặc “khu vực thất lưng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ khu vực giữa đốt sống thất lưng (lưng dưới) thứ ba và thứ tư và, rộng hơn là, vùng L2-S1 của cột sống.

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng bằng cách sử dụng dưới da (tức là bên dưới da). Đối với mục đích này, dược phẩm có thể được tiêm bằng cách sử dụng bơm tiêm. Tuy nhiên, các dụng cụ khác để dùng chế phẩm là sẵn có như dụng cụ để tiêm (ví dụ, dụng cụ Inject-easeTM và GenjectTM); bút tiêm (như GenPenTM); dụng cụ không dùng kim tiêm (ví dụ, MediJectorTM và BioJectorTM); và hệ phân phối qua da ở dạng miếng dán.

Theo một số phương án, cách dùng qua đường nội tủy mạc có thể được áp dụng cùng với các đường dùng khác (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, bắp, ngoài đường tiêu hóa, qua da, hoặc qua niêm mạc (ví dụ, qua đường miệng hoặc qua đường mũi)).

Sáng chế bao gồm việc sử dụng đơn lẻ cũng như việc sử dụng nhiều lần I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này. I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được dùng với thời gian ngắt quãng thông thường, tùy theo bản chất, mức độ nghiêm trọng và mức độ của tình trạng bệnh của đối tượng (ví dụ, bệnh tích lũy ở thể tiêu bào). Theo một số phương án, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được dùng một cách định kỳ với thời gian ngắt quãng thông thường (ví dụ, mỗi năm một lần, sáu tháng một lần, năm tháng một lần, ba tháng một lần, hai tháng một lần (đôi tháng một lần), hàng tháng (mỗi tháng một lần), đôi tuần một lần (hai tuần một lần), hằng tuần, hằng ngày hoặc liên tục).

I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được bào chế với chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc tá dược để bào chế dược phẩm. Chất mang và tác nhân điều trị bệnh có thể là vô trùng. Dược phẩm cần phù hợp với đường dùng.

Các chất mang được dùng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, dung dịch muối (ví dụ, NaCl), nước muối, nước muối đã được đậm, rượu, glyxerol, etanol, gôm arabic, dầu thực vật, rượu benzylic, các polyetylen glycol,

gelatin, hydrat cacbon như lactoza, amyloza hoặc tinh bột, các loại đường như manitol, sucroza, hoặc chất khác, dextroza, magie stearat, bột talc, axit silixic, parafin nhớt, dầu thơm, este của axit béo, hydroxymetylxenluloza, polyvinyl pyrolidon, v.v., cũng như hỗn hợp của chúng. Dược phẩm, nếu muốn, có thể được trộn với các tác nhân phụ trợ (ví dụ, chất làm trơn, chất bảo quản, chất làm ổn định, tác nhân làm ẩm, chất nhũ hóa, muối để làm ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu, dung dịch đệm, chất tạo màu, điều vị và/hoặc hương liệu và tương tự) mà không phản ứng có hại với các hoạt chất hoặc can thiệp đến hoạt tính của chúng. Theo một số phương án, chất mang hòa tan trong nước thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch được sử dụng.

Dược phẩm hoặc thuốc, nếu muốn, còn có thể chứa tác nhân làm ẩm hoặc tác nhân nhũ hóa, hoặc chất đệm pH với lượng không đáng kể. Dược phẩm này có thể là dung dịch lỏng, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, dược phẩm giải phóng duy trì, hoặc bột. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế ở dạng thuốc đặt hậu môn, cùng với các chất kết dính và các chất mang thông thường như triglyxerit. Dược phẩm dùng qua đường miệng có thể chứa các chất mang chuẩn như manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, polyvinyl pyrolidon, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat loại dùng cho dược phẩm, v.v..

Dược phẩm hoặc thuốc có thể được bào chế theo các quy trình thông thường thành dược phẩm được làm thích ứng để sử dụng cho người. Ví dụ, theo một số phương án, dược phẩm dùng qua đường tĩnh mạch thường là dung dịch trong nước đệm đẳng trương vô khuẩn. Nếu cần, dược phẩm này có thể còn chứa tác nhân hòa tan và chất gây tê tại chỗ để giảm đau tại vị trí tiêm. Nói chung, các thành phần được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ, ở dạng bột đông khô hoặc thể đặc không chứa nước trong vật chứa đóng kín như ống hoặc gói nhỏ có chỉ rõ lượng hoạt chất. Khi dược phẩm này sẽ được dùng bằng cách truyền, có thể được phân tán nó với chai truyền chứa nước, nước muối hoặc dextroza/nước loại dùng cho dược phẩm vô khuẩn. Khi dược phẩm này được dùng bằng cách tiêm, ống nước vô khuẩn để tiêm hoặc nước muối có thể được bổ sung sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này được xác định rộng rãi trên cơ sở tổng lượng tác nhân điều trị bệnh chứa trong các

được phẩm theo sáng chế. Nói chung, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh là đủ để đạt được lợi ích có ý nghĩa cho đối tượng (ví dụ, điều trị bệnh, điều biến, chữa trị, phòng bệnh và/hoặc làm giảm nhẹ bệnh hoặc tình trạng bệnh lý tiềm ẩn). Ví dụ, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh có thể là lượng đủ để đạt được tác dụng điều trị và/hoặc phòng bệnh mong muốn, như lượng đủ để điều biến các thụ thể enzym thể tiêu bào hoặc hoạt tính của chúng để qua đó, điều trị bệnh tích lũy ở thể tiêu bào hoặc các triệu chứng của chúng (ví dụ, giảm hoặc loại bỏ sự có mặt hoặc tỷ lệ mắc “thể vằn” hoặc làm cho tế bào có không bào sau khi dùng được phẩm theo sáng chế cho đối tượng). Nói chung, lượng tác nhân điều trị bệnh (ví dụ, enzym tái tổ hợp trong tiêu thể) được dùng cho đối tượng có nhu cầu điều trị sẽ phụ thuộc vào các đặc tính của đối tượng. Các đặc tính này bao gồm tình trạng bệnh, mức độ nặng của bệnh, tình trạng sức khỏe chung, lứa tuổi, giới tính và thể trọng của đối tượng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định liều lượng thích hợp tùy theo các yếu tố này và các yếu tố liên quan khác. Ngoài ra, cả thử nghiệm khách quan và thử nghiệm chủ quan có thể tùy ý được áp dụng để xác định khoảng liều lượng tối ưu.

Lượng hữu hiệu để điều trị bệnh thường được dùng trong phác đồ liều dùng có thể bao gồm nhiều liều đơn vị. Đối với protein điều trị cụ thể bất kỳ, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh (và/hoặc liều đơn vị thích hợp trong phác đồ liều dùng hiệu quả) có thể thay đổi, ví dụ, tùy theo đường dùng, theo sự kết hợp với các tác nhân được phẩm khác. Ngoài ra, lượng hữu hiệu đặc hiệu để điều trị bệnh (và/hoặc liều đơn vị) đối với mỗi bệnh nhân cụ thể có thể phụ thuộc vào nhiều loại yếu tố bao gồm rối loạn cần điều trị và mức độ nặng của rối loạn đó; hoạt tính của dược chất đặc hiệu được sử dụng; được phẩm cụ thể được dùng; lứa tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ dinh dưỡng của bệnh nhân; thời gian dùng, đường dùng, và/hoặc tốc độ bài tiết hoặc chuyển hóa của protein dung hợp đặc hiệu được sử dụng; khoảng thời gian kéo dài điều trị; và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

Các dược phẩm và các phương pháp sử dụng làm ví dụ khác được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO2011/163649 có tên “*Phương pháp và dược phẩm để phân phối Iduronat-2-sulfataza vào hệ thần kinh trung ương (CNS)*” và đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 61/618,638 có tên “*Sử dụng iduronat 2 sulfataza dưới da*” nộp

ngày 30 tháng 3 năm 2012, mà toàn bộ nội dung của cả hai đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Cần phải hiểu thêm nữa rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều lượng cụ thể cần được điều chỉnh sau một khoảng thời gian theo nhu cầu của cá thể và đánh giá chuyên môn của người cho dùng hoặc giám sát việc áp dụng liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế và khoảng liều lượng nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm để giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình bắt giữ và tinh chế I2S AF tái tổ hợp

Ví dụ này thể hiện quy trình tinh chế thuận đã được đơn giản hóa có thể được áp dụng để bắt giữ và tinh chế I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh. Sơ đồ tinh chế làm ví dụ được thể hiện trên Hình 1.

Dòng tế bào biểu hiện một cách ổn định enzym iduronat-2-sulfatase (I2S) và enzym sinh ra formylglyxin (FGE) đã được phát triển. Việc tạo ra và xác định tính chất của các dòng tế bào làm ví dụ được bộc lộ trong đơn tạm thời yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ có tên “*Tế bào tạo ra Iduronat-2-sulfatase tái tổ hợp*” nộp cùng ngày với đơn yêu cầu cấp patent này, mà toàn bộ nội dung của đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Một cách vắn tắt, dòng tế bào của người được xử lý để cùng biểu hiện protein I2S của người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và enzym sinh ra formylglyxin (FGE) của người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO: 2

> Tiên chất iduronat 2-sulfatase có chiều dài đầy đủ

MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGC
YGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFN
SYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPY
HPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQAIQLLEK
MKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYN
PWMDIRQREDVQALNISVPYGPVPDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSAL
DDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLP
EAGEKLFPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDELVSFLPTLAGLAGLQVPPRCPV
PSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSD
KPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEF LANFSDIHAGELYFVDS DPLQD
HNMYNDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO: 5

Tiền chất FGE của người có chiều dài đầy đủ:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGC
GTPQRPGAHGSSAAAHRYREANAPGPVGERQLAHSKMVPIAGVFTMGTD
DPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEKFFVNSTGYLTEAEKFGDSFV
FEGMLSEQVKTNIQQA VAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLH
VSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHY
ANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGYGLYNIVGNAWEWTSDWWT
VHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSA
SNLGRCAADRLPTMD

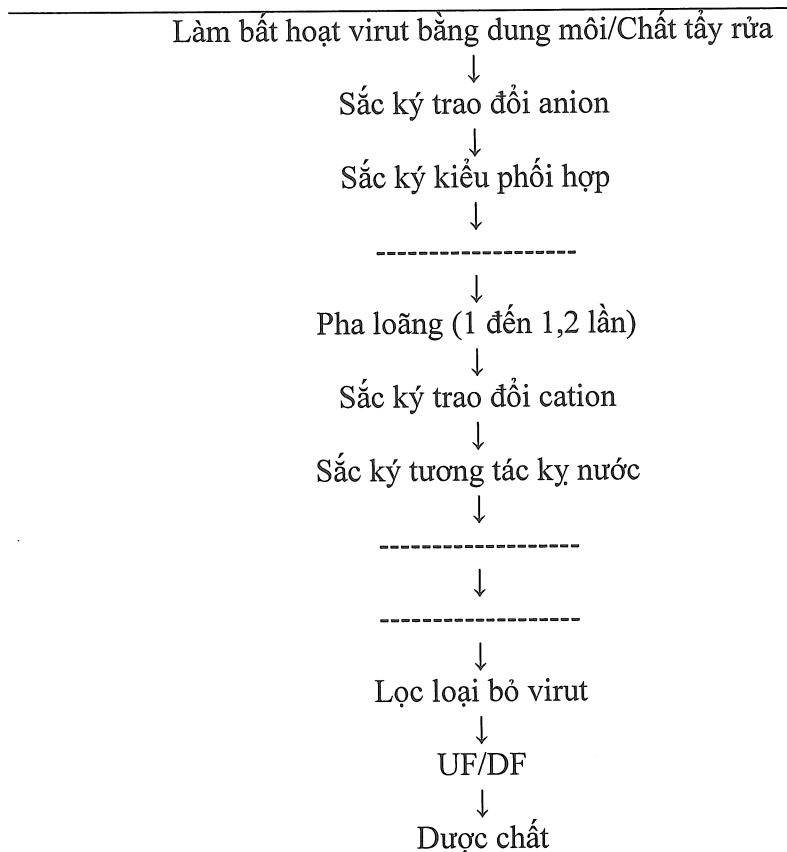
Sau khi tổng hợp enzym I2S có chiều dài đầy đủ, peptit dẫn truyền tín hiệu gồm 25 axit amin được loại bỏ và enzym I2S thành thực hòa tan được tiết ra từ tế bào.

Môi trường xác định về mặt hóa học (không chứa huyết thanh/không chứa thành phần có nguồn gốc động vật; AF) được sử dụng trong quy trình thùng phản ứng sinh học.

Chất liệu thu gom riêng biệt được làm giảm thể tích và trao đổi dung dịch đệm thông qua quy trình siêu lọc/thẩm lọc. Chất liệu này, được gọi là nguyên liệu thô không được tinh chế (UPB), được làm đông lạnh ở -50°C trên mỗi quần thể thu gom riêng biệt. Quy trình tinh chế thuận bắt đầu bằng việc rã đông và thu gom nguyên liệu thô không được tinh chế và lần lượt bao gồm các bước làm bất hoạt virus, sắc ký trao đổi anion (Capto Q), sắc ký kiểu phối hợp (hydroxyapatit gồm), sắc ký trao đổi cation (SP Sepharosa) và sắc ký tương tác kỵ nước (Phenyl Sepharosa), tiếp theo là lọc virus, và cuối cùng là làm đặc và lọc thẩm tách. Cụ thể, quy trình tinh chế này áp dụng cách thức sắc ký Q, hydroxyapatit, SP và Phenyl. Bước sắc ký protein G và sắc ký loại trừ theo cỡ thường vẫn được áp dụng trong quy trình tinh chế I2S được loại bỏ. Các bước làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Các bước làm ví dụ của quy trình tinh chế

Thu gom
UF/DF
Bảo quản đông lạnh
Rã đông, Thu gom và Lọc sâu ↓



Protein I2S đã tinh chế được đánh giá về độ tinh khiết bằng cách lập bản đồ peptit, SDS-PAGE (Bạc), sắc ký lỏng cao áp (HPLC) loại trừ theo kích thước. Hoạt tính đặc hiệu của enzyme, hàm lượng formylglyxin, hàm lượng axit sialic, bản đồ glycan, biên dạng điện tích được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn. Các kết quả làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Phân tích protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế

Thử nghiệm		Tinh chế I2S (quy mô 10l) tối thiểu-tối đa (n)
Lập bản đồ peptit	L1	100% đến 105% (n=3)
	L10	98% đến 100% (n=3)
	L12	102% đến 102% (n=3)
	L13	96% đến 97% (n=3)
	L14	102% đến 103% (n=3)
	L17	101% đến 101% (n=3)
	L20	102% đến 103% (n=3)
Protein tế bào chủ		≤62,5 (n=5)
SDS-PAGE(Bạc)		Phù hợp
HPLC trao đổi ion	% Đỉnh A	69% đến 69% (n=2)
	% Đỉnh B	20% đến 21% (n=2)

% Đỉnh E+F		10% đến 11% (n=2)
HPLC loại trừ theo cỡ		99,9% đến 99,9% (n=5)
Hấp thu tế bào (thử nghiệm sinh học)		85%, 95% và 97% (n=3)
% Formylglyxin		87% đến 95% (n=5)
Hoạt tính đặc hiệu		62 đến 78 (n=5)
Bản đồ glycan	Nhóm đỉnh 3	88% đến 93% (n=5)
	Nhóm đỉnh 5	72% đến 110% (n=5)
	Nhóm đỉnh 6	124% đến 133% (n=5)
	Nhóm đỉnh 7	78% đến 87% (n=5)
	Diện tích toàn phần	94% đến 116% (n=5)
Axit sialic		16 đến 22 (n=4)
Nội độc tố		<0,04-<0,05 (n=2)
Lượng nạp sinh học		0,00-0,00 (n=2)

Bản đồ peptit làm ví dụ so với I2S tham chiếu có bán trên thị trường được thể hiện trên Hình 2. Kết quả phân tích SDS-PAGE (Bạc) làm ví dụ được thể hiện trên Hình 3. Nói chung, bằng cách áp dụng quy trình được bộc lộ trong bản mô tả này, nồng độ HCP của dược chất (DS) là <100ppm, đáp ứng yêu cầu <100ppm ở nhiều thị trường kể cả Mỹ. SEC của DS là $\geq 99,5\%$ cũng đáp ứng yêu cầu hiện nay của thị trường là >99,3% ở nhiều thị trường. Biên dạng điện tích làm ví dụ được thể hiện trên Hình 4. Bản đồ glycan làm ví dụ được thể hiện trên Hình 5. Cụ thể, bản đồ glycan của I2S đã được tinh chế bao gồm bảy Nhóm đỉnh, được rửa giải theo lượng điện tích âm tăng dần từ các gốc axit sialic và mannoza-6-phosphat, được thể hiện theo trình tự rửa giải, là glycan trung tính, mono-, disialyl hóa, mono phosphoryl hóa, trisialyl hóa và lai (monosialyl hóa và M6P bị che), tetrasialyl hóa và lai (disialyl hóa và M6P bị che) và diphosphoryl hóa.

Tóm lại, ví dụ này cho thấy rằng quy trình tinh chế bốn cột đơn giản hóa có thể được áp dụng để tinh chế thành công I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường không chứa động vật ở quy mô lớn.

Ví dụ 2: Nghiên cứu về độ ổn định của I2S tái tổ hợp AF khi thu gom và làm bất hoạt virus

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá tác động của nhiệt độ lưu giữ và chu kỳ làm đông-rã đông đối với độ ổn định của quần thể thu hoạch I2S tái tổ hợp đã được làm trong.

Các mẫu quần thể thu hoạch đã làm trong được bảo quản ở nhiệt độ xung quanh và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian tối đa đến bảy ngày và các mẫu UPB đã bị làm bất hoạt virus được giữ ở nhiệt độ xung quanh trong thời gian đến 24 giờ. Các mẫu làm đông-rã đông trên quần thể thu hoạch đã làm trong được làm đông lạnh ở -20°C, -50°C, và -80°C và cho trải qua tối đa là ba chu kỳ làm đông-rã đông. Độ ổn định được đo bằng cách áp dụng thử nghiệm thẩm tách tây, sắc ký lỏng cao áp (HPLC) SEC, và thử nghiệm hoạt tính.

Chất liệu thu gom I2S-AF được sản xuất từ dòng tế bào 2D bằng CCPD bằng cách sử dụng thùng phản ứng sinh học B. Braun loại dung tích 20l với thiết bị lưu giữ ly tâm và tốc độ rút mong muốn. Đối với nghiên cứu tăng nhiệt độ, mỗi quần thể thu hoạch đã được làm trong được bảo quản ở nhiệt độ xung quanh và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C và được lấy mẫu tại các thời điểm chọn lọc. Lượng mẫu và số lần tăng được liệt kê trong Bảng 5. Các mẫu làm lạnh-rã đông được bảo quản ở -20°C, -50°C, và -80°C và rã đông bằng cách sử dụng bể nước ở 25°C.

Bảng 5. Độ ổn định của quần thể thu hoạch được làm trong tại thời điểm lưu giữ

	Mẫu	Nhiệt độ lưu giữ	Thời gian lưu giữ (Ngày)
Quần thể thu hoạch đã được làm trong số 12	15 x 0,5ml	nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C	T=0, 24 giờ, 76 giờ, 120 giờ, 168 giờ
	15 x 0,5ml	Nhiệt độ xung quanh	T=0, 24 giờ, 76 giờ, 120 giờ, 168 giờ
	9 x 0,5ml	-20°C, -50°C, và -80°C	Làm đông/Rã đông 1, 2, và 3
Quần thể thu hoạch đã được làm trong số 18	15 x 0,5ml	nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C	T=0, 24 giờ, 76 giờ, 120 giờ, 168 giờ
	15 x 0,5ml	Nhiệt độ xung quanh	T=0, 24 giờ, 76 giờ, 120 giờ, 168 giờ
	9 x 0,5ml	-20°C, -50°C, và -80°C	Làm đông/Rã đông 1, 2, và 3

Bước làm bất hoạt virus được thực hiện ở bước nguyên liệu thô không được tinh chế trước khi nạp vào cột thứ nhất. UPB tạo ra bằng cách làm đặc và trao đổi dung dịch đệm với quần thể thu hoạch được làm trong. UF/DF được thực hiện bằng cách sử dụng Pall 1 feet-vuông (sq. ft.). Hệ Centramate và dung dịch đệm được trao đổi vào

MES 10mM, NaCl 155mM, độ pH=6,5. Bước làm bất hoạt virus được bổ sung 1% Tween 80 và 0,3% TnBP, được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc bơm tiêm Durapore cho mỗi thời điểm. Các mẫu được lấy tại mỗi thời điểm liệt kê trong Bảng 6 và làm đông lạnh ở -80°C. Các mẫu quần thể thu hoạch được làm trong tại thời điểm lưu giữ và nghiên cứu làm đông-rã đông được thử bằng thử nghiệm thẩm tách tây và hoạt tính (thử nghiệm 4-MU). Các mẫu UPB từ bước làm bất hoạt virus được thử độ tinh khiết theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) SEC. Các kết quả về hoạt tính tại thời điểm lưu giữ từ quần thể thu hoạch 12 và 18 trong Bảng 5 không thể hiện thay đổi đáng kể nào khi bảo quản đến 7 ngày ở nhiệt độ xung quanh và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C đối với cả hai quần thể thu hoạch. Không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể về hoạt tính của quần thể thu hoạch 12 đến 3 chu kỳ làm đông-rã đông được bảo quản ở -20°C, -50°C, và -80°C.

Bảng 6. Làm bất hoạt virus cho nguyên liệu thô không được tinh chế

	Mẫu	Nhiệt độ giữ	Thời gian giữ (ngày)
Làm bất hoạt virus	9 x 0,5ml	Nhiệt độ xung quanh, đôi chứng	T=0, 6 giờ, 24 giờ
	9 x 0,5ml	Nhiệt độ xung quanh, làm bất hoạt virus	T=0, 6 giờ, 24 giờ

Hoạt tính và SEC-HPLC về độ ổn định của bước làm bất hoạt virus UPB được thể hiện trên Hình 6 và Hình 7. Điều này cho thấy rằng không có vấn đề gì về độ ổn định khi làm bất hoạt virus dựa vào hoạt tính và độ tinh khiết trong thời gian đến 24 giờ.

Tóm lại, dựa vào phân tích độ ổn định được bộc lộ trong bản mô tả này, quần thể thu hoạch được làm trong có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C (ví dụ, trong thời gian đến 7 ngày) mà không có thay đổi đáng kể về chất lượng thu hoạch. Quần thể thu hoạch được làm trong có thể cho trải qua nhiều chu kỳ làm đông-rã đông và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C, -50°C, và -80°C mà không có thay đổi đáng kể về độ ổn định. Trên cơ sở kết quả về độ tinh khiết của bước sắc ký lỏng cao áp (HPLC) SEC, việc làm bất hoạt virus ở bước UPB có thể được thực hiện ở nhiệt độ môi trường (ví dụ, trong thời gian đến 24 giờ) mà không có thay đổi về hoạt tính và độ tinh khiết.

Ví dụ 3: Tinh chế và phân tích mẫu chạy xác nhận môi trường không chứa thành phần có nguồn gốc động vật IL CD

Mục đích của thử nghiệm này là thực hiện việc tinh chế quần thể thu hoạch thu gom được chứa I2S-AF được tạo ra khi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng không chứa thành phần có nguồn gốc động vật bằng cách sử dụng môi trường xác định về mặt hóa học và để xác định đặc điểm của dược chất.

Nghiên cứu này đánh giá tính năng của quy trình tinh chế I2S-AF và dược chất (DS) được tạo ra từ thùng phản ứng sinh học chứa môi trường xác định về mặt hóa học.

Môi trường nuôi cấy tế bào

Chất liệu I2S-AF được sản xuất từ dòng tế bào 2D biểu hiện I2S và enzym sinh ra formylglyxin (FGE)) như được mô tả trong Ví dụ 1. Chất liệu này được sản xuất trong CCPD trong thùng phản ứng sinh học có bộ lọc quay Das Gip có dung tích 11 bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh xác định về mặt hóa học. Các túi riêng biệt được lấy từ mỗi quần thể thu hoạch đã làm trong (HI-21) được làm đông lạnh ở -20°C và rã đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C qua đêm. Thể tích ngang bằng của mỗi quần thể thu hoạch được làm trong dược thu gom để biểu thị toàn bộ quần thể thu hoạch được thu gom, sau đó lọc qua bộ lọc cỡ 0,2µm và làm đặc bằng cách sử dụng catxet Pall Omega Centramate 30kD có diện tích màng toàn phần là 1 fit-vuông (ft²). Nguyên liệu thô không được tinh chế (UPB) được lọc qua bộ lọc cỡ 0,2µm và làm đông lạnh trước khi dùng.

Tinh chế

Các đặc tính của cột và cách nạp làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 7. Q Sepharose được nạp đến mức 3g/l bằng cách chuẩn độ. Các cột tiếp theo được nạp ở mức 100% bằng dịch rửa giải từ cột trước nó và không loại bỏ chất liệu.

Bảng 7. Mô tả cột và cách nạp

Cột	Kích thước cột (cm x cm)	Thể tích cột (ml)	Lượng nạp vào cột (g/l nhựa theo I2S)	Lượng nạp vào cột (mg)
Q Sepharose	2,6 x 25	133	3	399
HA Type II, 80µm	1,6 x 30	60	5,5	330
Phenyl Sepharose	1,6 x 23	46	5,6	258

Một lần chạy tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng UPB thu được từ các quần thể thu hoạch thu gom được từ 1 đến 21 từ thùng phản ứng sinh học. UPB được rửa đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C qua đêm và được thu gom từ các thể tích bằng nhau của mỗi quần thể thu hoạch.

Các bước xử lý cột riêng biệt và các chế phẩm dung dịch đệm có thể được nêu trong các bảng 8 đến 11. UPB được thu gom được lọc bằng cách sử dụng hệ chai lọc 0,2µm, được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng cách sử dụng natri axetat 1M, và độ dẫn điện được điều chỉnh đến 16mS/cm bằng natri clorua 5M trước khi nạp lên cột Q Sepharose FF. Việc rửa giải Q Sepharose được điều chỉnh đến 0,001M NaPO₄ bằng cách sử dụng NaPO₄ 0,25M, độ pH=5,5 và lọc bằng bộ lọc chai phía trên cỡ 0,22µm PES trước khi nạp lên cột HA. Độ dẫn điện của dịch rửa giải HA được điều chỉnh đến NaCl 1,55M bằng NaCl 5M và độ pH được điều chỉnh đến độ pH=5,5 bằng natri axetat 1M. Thời gian điều chỉnh là khoảng 1 giờ. Quần thể thu hoạch điều chỉnh được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc chai phía trên cỡ 0,22µm PES trước khi nạp lên cột Phenyl Sepharose. Dịch rửa giải phenyl được làm đặc 4X và lọc thẩm tách 6X vào NaPO₄ 0,02M, NaCl 0,137M, độ pH = 6,0. Sản phẩm lọc thẩm tách được điều chỉnh đến 2,0g/l và được bào chế với 0,2% Polysorbate 20 để tạo ra được chất mô hình giả. Mô hình giả chứa H1-20 của DS được tạo ra để xác định các đặc tính khác.

Bảng 8. Chi tiết quy trình làm ví dụ để sắc ký Q Sepharose FF

Bước của quy trình	Tốc độ dòng (cm/giờ)	CV	Dung dịch đệm
Làm vệ sinh	150	3	NaOH 0,5N
Làm cân bằng	150	4	MES 0,01M, NaCl 0,155M, độ pH = 6,5
Rửa 1	150	2	MES 0,01M, NaCl 0,155M, độ pH = 6,5
Rửa 2	150	3	MES 0,01M, NaCl 0,155M, độ pH=5,5
Rửa giải	150	3	MES 0,01M, NaCl 0,50M, độ pH=5,5
Làm sạch/loại bỏ	150	4	NaOH 1,0M, NaCl 2M
Bảo quản	150	4	NaOH 0,0 N

Bảng 9. Chi tiết quy trình làm ví dụ để sắc ký HA

Bước của quy trình	Tốc độ dòng (cm/giờ)	CV	Dung dịch đệm
Làm vệ sinh	200	3	NaOH 0,5N
Tích điện	200	3	NaPO ₄ 0,250, độ pH=5,5
Làm cân bằng	200	3-6	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,001M, NaCl 0,5M, độ pH=5,5
Rửa 1	200	1	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,001M, NaCl

			0,5M, độ pH=5,5
Rửa 2	200	6	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,01M, NaCl 0,5M, độ pH=5,5
Rửa giải	200	3	MES 0,01M, NaPO ₄ 0,08M, độ pH=5,5
Loại bỏ	200	4	NaPO ₄ 0,4M, độ pH=12
Làm sạch	200	4	NaOH 0,5 N
Bảo quản	200	4	NaOH 0,1 N

Bảng 10. Chi tiết quy trình làm ví dụ để sắc ký phenyl Sepharose

Bước của quy trình	Tốc độ dòng (cm/giờ)	CV	Dung dịch đệm
Làm vệ sinh	150	3	NaOH 0,5 N
Làm cân bằng	150	4-6	MES 0,02M, NaCl 1,5M, độ pH=5,5
Rửa	150	2	MES 0,02M, NaCl 1,5M, độ pH=5,5
Rửa giải	150	3	MES 0,02M, NaCl 0,2M, độ pH=5,5
Rửa bằng nước	150	3	Nước RO/DI
Rửa bằng etanol	150	3	Etanol 20%
Làm sạch	150	3	NaOH 0,5 N
Bảo quản	150	3	NaOH 0,01 N

Bảng 11. Lọc thẩm tách làm ví dụ đối với phân thu hoạch dịch rửa giải phenyl

Đơn vị lọc	Centricon Plus 70
Dung dịch đệm lọc thẩm tách	NaPO ₄ 0,02M, NaCl 0,137M, độ pH = 6,0
Thế tích lọc thẩm tách	6X-8X

Độ tinh khiết trong quy trình theo HCP theo ELISA

Bảng 12 thể hiện mức độ loại bỏ HOP trong quy trình theo từng bước. Kết quả HCP trong quy trình là cao, trong đó phần lớn lượng loại bỏ là ở bước HA.

Bảng 12. Loại bỏ HCP trong quy trình

Bước	HCP (ng/mg)	LRV	Số lần HCP
Q	46,392	0,3	2
	51,957		
HA	51,957	1,3	18
	5,876		
Phenyl	5,876	0,7	5
	1,870		

Xác định đặc tính dược chất

Kết quả giải phóng lô dược chất làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 13. Như có thể thấy, nguyên liệu đã tinh chế, dược chất có hoạt tính đặc hiệu và %FG cao trong.

Các đặc tính của thuốc làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 13. HCP giảm từ 1,870ng/mg đến 372ng/mg trong bước UF/DF cuối cùng.

Bảng 13. Giải phóng lô dược chất làm ví dụ

Giải phóng lô dược chất	1L môi trường CD (I2S-AF)
%FG	94%
Bản đồ Glycan	
Nhóm 3	99%
Nhóm 5	89%
Nhóm 6	104%
Nhóm 7 (2-M6P)	95%
Diện tích toàn phần	107%
Axit sialic	17
Nhập bào	83%
SEC-HPLC	99,9%
Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)	82
Sắc ký lỏng cao áp (HPLC)	
IEX	
A (%)	64%
B (%)	23%
A+B	87%
E+F	0%
Protein của tế bào chủ	372
Hấp thu tế bào	98

Ví dụ 4. Xác định tính chất hóa lý và sinh học của enzym I2S tái tổ hợp đã được tinh chế

Mục đích của Ví dụ này là thực hiện việc xác định tính chất chi tiết của protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp nêu trên.

SDS-PAGE

Đối với thử nghiệm, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng các dòng tế bào 2D và 4D của người, trong hai phản ứng nuôi cấy tế bào riêng biệt trong môi trường không chứa huyết thanh. Các mẫu được gom và tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp nêu trên. Enzym I2S đã được tinh chế được phân tích bằng SDS-PAGE, và xử lý bằng cách nhuộm bạc để hiển thị. Các kết quả làm ví dụ được thể hiện trên Hình 8. Như có thể thấy từ Hình 8, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có mô hình

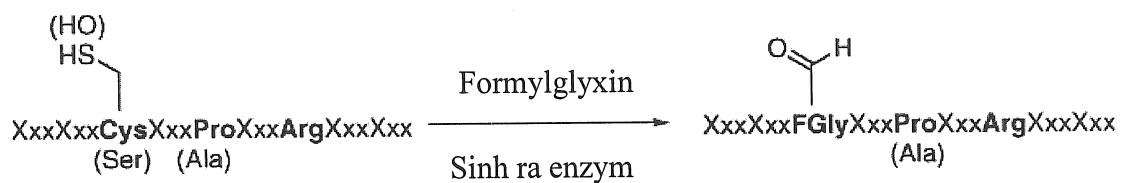
dải tương đương với mẫu tham chiếu I2S được tinh chế bằng cách áp dụng phương pháp tiêu chuẩn.

Bản đồ peptit

Protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bởi dòng tế bào I2S-AF 2D được tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp như nêu trên. Từng I2S tái tổ hợp đã được tinh chế và mẫu I2S tham chiếu của người được phân cắt bằng cách phân giải protein và kiểm tra theo phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Bản đồ peptit làm ví dụ so với bản đồ peptit của I2S tham chiếu được thể hiện trên Hình 9.

Phản trăm chuyển hóa formylglyxin

Việc lập bản đồ peptit có thể được áp dụng để xác định phần trăm chuyển hóa FGly. Việc hoạt hóa I2S cần phải chuyển hóa xystein (tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người) thành formylglyxin bằng enzym sinh ra formylglyxin (FGE) như được thể hiện dưới đây:



Do đó, tỷ lệ phần trăm của formylglyxin chuyển hóa (%FG) có thể được tính bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\%FG \text{ (của DS)} = \frac{\text{số phân tử I2S hoạt tính}}{\text{số phân tử I2S toàn phần (hoạt tính + không hoạt tính)}} \times 100$$

Ví dụ, 50% FG có nghĩa là một nửa I2S tái tổ hợp đã được tinh chế không có hoạt tính enzym và không có tác dụng điều trị bệnh.

Việc lập bản đồ peptit được dùng để tính % FG. Một cách vắn tắt, protein I2S tái tổ hợp được phân cắt thành các peptit ngắn bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, trypsin hoặc chymotrypsin). Các peptit ngắn được tách và được xác định tính chất bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Peptit này chứa vị trí tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người được xác định tính chất để xác định xem Cys ở vị trí 59 có được chuyển hóa thành FGly so với đối chứng (ví dụ, protein I2S mà không chuyển hóa thành FGly hoặc protein I2S mà chuyển hóa 100% FGly). Lượng peptit chứa FGly (tương ứng với số phân tử I2S hoạt tính) và tổng lượng peptit với cả

hai FGly và Cys (tương ứng với tổng số phân tử I2S) có thể được xác định trên cơ sở diện tích đỉnh tương ứng và tỷ lệ này phản ánh %FG được tính. Kết quả làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 14.

Bản đồ Glycan- Hàm lượng manosa-6-phosphat và axit sialic

Thành phần glycan và axit sialic của protein I2S tái tổ hợp được tạo ra trong điều kiện nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh được xác định. Định lượng của thành phần glycan được thực hiện, bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi anion. Như được mô tả dưới đây, bản đồ glycan của I2S tái tổ hợp được sinh ra trong các điều kiện này bao gồm bảy Nhóm đỉnh, rửa giải theo lượng điện tích âm tăng dần, ít nhất một phần dạng glycogen thu được từ axit sialic và manosa-6-phosphat tạo ra do sự phân cắt bằng enzym. Một cách vắn tắt, I2S tái tổ hợp tinh chế thu được bằng cách áp dụng phương pháp nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh (I2S-AF 2D không chứa huyết thanh và I2S-AF 4D không chứa huyết thanh) và I2S tái tổ hợp tham chiếu được tạo ra, xử lý bằng (1) enzym neuraminidaza tinh chế (phân lập từ *Arthrobacter Ureafaciens* (10mU/ μ l), do Roche Biochemical (Indianapolis, IN) cung cấp, số thứ tự trong danh mục sản phẩm (Cat. #) 269 611 (1U/100 μ l)) để loại bỏ các gốc axit sialic, (2) phosphataza kiềm trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ để giải phóng hoàn toàn các gốc manosa-6-phosphat, (3) phosphataza kiềm + neuraminidaza, hoặc (4) không xử lý. Mỗi sản phẩm phân cắt enzym được phân tích bằng sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với bộ dò xung điện (HPAE-PAD) bằng cách sử dụng cột phân tích CarboPac PA1 có lắp cột bảo vệ Dionex CarboPac PA1. Một loạt chất chuẩn axit sialic và manosa-6-phosphat trong khoảng từ 0,4nmol đến 2,0nmol được chạy cho mỗi thử nghiệm. Phương pháp đẳng dung môi bằng cách sử dụng 48mM natri axetat trong 100mM natri hydroxit được thực hiện trong thời gian ít nhất 15 phút với tốc độ dòng 1,0ml/phút ở nhiệt độ xung quanh để rửa giải mỗi đỉnh. Dữ liệu thu được từ mỗi lần chạy mẫu riêng biệt, đối với cả mẫu I2S-AF và mẫu I2S tham chiếu, từng dữ liệu được gộp lại thành một sắc ký đồ đơn nhất để biểu thị bản đồ glycan đối với mỗi nhóm protein tái tổ hợp tương ứng. Như được thể hiện trên Hình 10, bản đồ glycan làm ví dụ đối với I2S tinh chế được từ môi trường không chứa huyết thanh thể hiện các đỉnh rửa giải tiêu biểu (theo thứ tự rửa giải) bao gồm glycan trung tính, glycan đã được mono-, glycan đã được disialyl hóa, glycan đã được mono phosphoryl hóa,

glycan đã được trisialyl hóa và lai (glycan đã được monosialyl hóa và có đoạn mũ manosa-6-phosphat), glycan đã được tetrasialyl hóa và lai (glycan đã được disialyl hóa và có đoạn mũ manosa-6-phosphat) và glycan đã được diphosphoryl hóa. Bản đồ glycan làm ví dụ được thể hiện trên Hình 10.

Hàm lượng axit sialic trung bình (số mol axit sialic trên mỗi mol protein) trong mỗi nhóm mẫu I2S tái tổ hợp tính được từ phân tích hồi quy tuyến tính chất chuẩn axit sialic. Mỗi lần chạy sắc phổ được hiển thị bằng cách sử dụng Phần mềm PicNet 6. Chuẩn axit sialic và axit sialic được giải phóng ra từ chất đối chứng thử nghiệm I2S tái tổ hợp và các mẫu thử nghiệm biểu thị ở dạng đỉnh đơn. Lượng axit sialic (nmol) đối với I2S được tính là trị số thô bằng cách sử dụng công thức sau:

$$\text{S.A. (mol trên mỗi mol I2S)} = \frac{(\text{nmol axit sialic})}{(0,3272)(C)}$$

trong đó C là nồng độ protein (tính theo mg/ml) của mẫu hoặc chất đối chứng thử nghiệm I2S tái tổ hợp.

Trị số hiệu chỉnh của axit sialic ở dạng mol axit sialic trên mỗi mol protein đối với mỗi mẫu thử nghiệm được tính bằng cách áp dụng công thức sau:

S.A. hiệu chỉnh

$$= \frac{(\text{trị số axit sialic thô của mẫu}) \times (\text{trị số đối chứng thử nghiệm Iduronat được thiết lập})}{(\text{trị số axit sialic thô của đối chứng thử nghiệm Iduronat})}$$

Dữ liệu ví dụ làm dấu hiệu chỉ báo về hàm lượng axit sialic trong I2S tái tổ hợp tạo ra bởi các dòng tế bào 2D hoặc 4D I2S-AF được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14: Các đặc tính làm ví dụ của I2S đã được tinh chế từ giống cây tế bào không chứa huyết thanh

Thử nghiệm	I2S-AF 2D (không chứa huyết thanh)
Lập bản đồ peptit	
L1	101
L10	100
L12	102
L13	97
L14	101
L17	100
L20	102

Protein tế bào chủ	< 62,5ng/mg
Sắc ký lỏng trao đổi ion cao áp % Diện tích	
Pic A	62
Pic A+B	82
Pic E+F	0
% Formylglyxin	87
Hoạt tính đặc hiệu (U/mg) (thử nghiệm sulfat giải phóng)	64
% sắc ký lỏng cao áp loại trừ theo kích thước	≥ 99,8 (n=13)
Lập bản đồ glycan	
Monosialyl hóa	105
Disialyl hóa	93
Mono phosphoryl hóa	139
Trisialyl hóa	89
Tetrasialyl hóa	125
Diphosphoryl hóa	95
Axit sialic (mol/mol)	20

Hoạt tính đặc hiệu

Hoạt tính đặc hiệu của enzym I2S tái tổ hợp được tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm giải phóng sulfat *in vitro* hoặc thử nghiệm 4-MUF.

Thử nghiệm giải phóng sulfat *in vitro*

Thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* được thực hiện bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất. Cụ thể, thử nghiệm này đo khả năng của I2S khi giải phóng các ion sulfat từ chất có nguồn gốc tự nhiên, heparin diasacarit. Sulfat giải phóng có thể được định lượng bằng sắc ký ion có lắp bộ dò dẫn điện. Một cách vắn tắt, đầu tiên các mẫu trao đổi dung dịch đệm đến 10mM Na axetat, độ pH = 6 để loại bỏ sự ức chế do các ion phosphat trong chế phẩm dung dịch đệm. Sau đó, các mẫu được pha loãng đến 0,075mg/ml bằng dung dịch đệm phản ứng (Na axetat 10mM, độ pH=4,4) và ủ trong thời gian 2 giờ ở 37°C với heparin disacarit với tỷ lệ enzym với cơ chất là 0,3µg I2S/100µg cơ chất trong 30µl thể tích phản ứng. Sau đó, phản ứng được ngừng bằng cách làm nóng các mẫu ở 100°C trong 3 phút. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng cột phân tích Dionex IonPac với cột bảo vệ IonPac AG18. Phương pháp đẳng dung môi được áp dụng với kali hydroxit 30mM ở 1,0ml/phút trong thời gian 15 phút. Lượng sulfat được giải phóng bởi mẫu I2S được tính từ phân

tích hồi quy tuyến tính chất chuẩn sulfat trong khoảng từ 1,7nmol đến 16,0nmol. Trị số có thể báo cáo được thể hiện theo đơn vị trên mg protein, trong đó 1 đơn vị được xác định là 1 μ mol sulfat được giải phóng mỗi giờ và nồng độ protein được xác định bằng phép đo A280. Các kết quả làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 14.

Thử nghiệm 4-MUF

Hoạt tính đặc hiệu của enzym I2S tái tổ hợp đã được tinh chế còn có thể được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở huỳnh quang 4-MUF. Một cách vắn tắt, thử nghiệm này đo mức độ thủy phân cơ chất I2S là 4-metylumbeliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄). Khi phân cắt cơ chất 4-MUF-SO₄ bằng I2S, phân tử này được chuyển hóa thành sulfat và huỳnh quang tự nhiên 4-metylumbeliferon (4-MUF). Kết quả là, hoạt tính enzym I2S có thể được xác định bằng cách đánh giá mức độ thay đổi tổng thể ở trình tự dẫn truyền tín hiệu huỳnh quang sau một khoảng thời gian. Đối với thử nghiệm này, enzym I2S tinh chế được ủ với dung dịch chứa 4-metylumbeliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄), muối của kali, Sigma Cat. # M-7133). Việc hiệu chỉnh thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng một loạt mẫu đối chứng tham chiếu, bằng cách sử dụng enzym I2S có bán trên thị trường đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:100, 1:200 và 1:20000 từ dung dịch gốc. Thử nghiệm enzym được thực hiện ở 37°C và được thử nghiệm bằng cách sử dụng huỳnh quang kế đã được hiệu chỉnh. Bằng cách sử dụng trị số huỳnh quang thu được đối với mỗi nhóm chất chuẩn tham chiếu, hệ số phần trăm biến thiên được xác định bằng cách sử dụng công thức sau:

$$\% CV = \frac{\text{độ lệch chuẩn của trị số huỳnh quang thô (N=3)}}{\text{trị số huỳnh quang trung bình}} \times 100\%$$

Sau đó, trị số phần trăm CV được dùng để tính huỳnh quang trung bình đã hiệu chỉnh đối với mỗi mẫu, để xác định hoạt tính enzym có thể báo cáo, được biểu thị theo mU/ml bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\text{mU/ml} = (\text{CFU}) \left(\frac{1\text{nmol/l}}{10\text{FU}} \right) \left(\frac{11}{10^3\text{ml}} \right) \left(\frac{(2,11\text{ml})}{(0,01\text{ml})} \right) \left(\frac{1\text{ giờ}}{60\text{ phút}} \right) \left(\frac{1\text{ mU}}{\text{nmol}} \right) (\text{DF})$$

CFU = Huỳnh quang trung bình đã hiệu chỉnh âm tính

DF - Hệ số pha loãng

Một mili đơn vị hoạt tính là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa 1 nanomol 4-metylumbeliferyl-sulfat thành 4-metylumbeliferon trong 1 phút ở 37°C.

Biên dạng điện tích

Đối với thử nghiệm này, phân bố điện tích của mỗi I2S tái tổ hợp đã được tinh chế được xác định theo sắc ký trao đổi anion mạnh (SAX), với hệ sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Phương pháp này tách các biến thể I2S tái tổ hợp bên trong mẫu, trên cơ sở sự khác biệt về điện tích bề mặt. Ở độ pH 8,00, các loại tích điện âm hấp thu lên trên điện tích dương được cố định của cột SAX. Gradient cường độ ion tăng dần được dùng để rửa giải mỗi loại protein theo tỷ lệ với cường độ tương tác ion của chúng với cột. Một trăm microgam I2S đã được tinh chế, phân lập từ dòng tế bào 2D trong điều kiện sinh trưởng không chứa huyết thanh hoặc enzym I2S tái tổ hợp tham chiếu, được nạp vào cột Amersham Biosciences Mini Q PE (4,6 x 50mm) được giữ ở nhiệt độ môi trường và cân bằng bằng Tris-HCl 20mM, độ pH 8,00. Gradient rửa giải được thực hiện với tốc độ dòng 0,80ml/phút, bằng cách sử dụng pha động Tris-HCl 120mM, natri clorua 1,0M, độ pH 8,00. Nồng độ protein được xác định một cách liên tục trong khi chạy, bằng cách đo độ hấp thu ánh sáng của mẫu rửa giải ở bước sóng 280nm. Các kết quả làm ví dụ thể hiện biên dạng điện tích quan sát được đối với I2S tái tổ hợp đã được tinh chế thu được từ các dòng tế bào 2D và 4D được thể hiện trên Hình 11.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin là SEQ ID NO:1,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly) và trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 150 ng/mg protein tế bào chủ (HCP).

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó protein I2S tái tổ hợp đã tinh chế:

(i) chứa ít nhất 10% oligosacarit đã được bis-phosphoryl hóa trên mỗi phân tử;

(ii) chứa trung bình ít nhất 16 axit sialic trên mỗi phân tử;

(iii) đặc trưng bởi có bản đồ glycan gồm bảy nhóm đỉnh hoặc ít hơn được chọn từ các nhóm đỉnh thể hiện protein I2S trung tính (nhóm đỉnh 1), được mono-sialylat hóa (nhóm đỉnh 2), được di-sialylat hóa (nhóm đỉnh 3), được monophosphoryl hóa (nhóm đỉnh 4), được tri-sialylat hóa (nhóm đỉnh 5), được tetra-sialylat hóa (nhóm đỉnh 6), hoặc được diphosphoryl hóa (nhóm đỉnh 7);

(iv) có hoạt tính riêng ít nhất 40 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfataza *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất; hoặc

(v) có hoạt tính riêng ít nhất 20 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 100 ng/mg HCP.

4. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 80 ng/mg HCP.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó protein I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít nhất 50% oligosacarit đã được bis-phosphoryl hóa trên mỗi phân tử.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 50 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfatase *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.
7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 60 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfatase *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 30 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).
9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 40 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 50 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).
11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 60 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất 75% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly).

13. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm trước đó, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất 85% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly).

14. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly) và ngoài ra

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 150 ng/mg protein tế bào chủ (HCP).

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 100 ng/mg HCP.

16. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 80 ng/mg HCP.

17. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít hơn 60 ng/mg HCP.

18. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất 75% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly) .

19. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất 85% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly) .

20. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có nhóm liên kết với thụ thể trên bề mặt của tế bào đích.

21. Chế phẩm theo điểm 20, trong đó nhóm này được dung hợp với protein I2S ở đầu tận cùng N, đầu tận cùng C hoặc bên trong mạch.

22. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly), và

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít nhất 10% oligosacarit đã được bis-phosphoryl hóa trên mỗi phân tử.

23. Chế phẩm theo điểm 22, trong đó Protein I2S tái tổ hợp đã tinh chế chứa ít nhất 50% oligosacarit đã được bis-phosphoryl hóa trên mỗi phân tử.

24. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly), và

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 40 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfataza *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.

25. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 50 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfataza *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.

26. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 60 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfatase *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.

27. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfatase (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc cystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly), và

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 20 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

28. Chế phẩm theo điểm 27, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 40 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

29. Chế phẩm theo điểm 27, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 40 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

30. Chế phẩm theo điểm 27, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 50 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

31. Chế phẩm theo điểm 27, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có hoạt tính riêng ít nhất 60 U/mg như được xác định bởi thử nghiệm xác định mức chuyển hóa *in vitro* của 4-metyumbelliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành 4-metyumbelliferon (4-MUF).

32. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfatase (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%, trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế :

- (i) có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly), và
- (ii) chứa trung bình, ít nhất 16 axit sialic trên mỗi phân tử.

33. Chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp đã tinh chế có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%,

trong đó I2S tái tổ hợp đã tinh chế có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly), và

trong đó I2S đã tinh chế đặc trưng bởi có bản đồ glycan gồm bảy nhóm đỉnh hoặc ít hơn được chọn từ các nhóm đỉnh thể hiện protein I2S trung tính (nhóm đỉnh 1), được mono-sialylat hóa (nhóm đỉnh 2), được di-sialylat hóa (nhóm đỉnh 3), được monophosphoryl hóa (nhóm đỉnh 4), được tri-sialylat hóa (nhóm đỉnh 5), được tetra-sialylat hóa (nhóm đỉnh 6), hoặc được diphosphoryl hóa (nhóm đỉnh 7).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Shire Human Genetic Therapies
 <120> CHẾ PHẨM CHỨA IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP ĐÃ TINH CHẾ
 <130> 2006685-0342
 <150> 61/666,733
 <151> 2012-06-29
 <160> 5
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Người
 <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
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
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
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> Người

<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> Người
 <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
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
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> Người
 <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> Người
 <400> 5
 Met Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Val Cys Gly Arg Cys Pro Glu Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Cys Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gly Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly
 35 40 45
 Ser Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser
 50 55 60
 Ala Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala
 85 90 95
 Gly Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly
 100 105 110
 Glu Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala
 115 120 125
 Tyr Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly

130	135	140	
Tyr Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly			
145	150	155	160
Met Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala			
	165	170	175
Ala Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu			
	180	185	190
Gly Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His			
	195	200	205
Val Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg			
	210	215	220
Leu Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His			
225	230	235	240
Asn Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His			
	245	250	255
Tyr Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu			
	260	265	270
Asp Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly			
	275	280	285
Tyr Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp			
	290	295	300
Trp Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly			
305	310	315	320
Pro Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys			
	325	330	335
His Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn			
	340	345	350

Thr Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp

355

360

365

Arg Leu Pro Thr Met Asp

370

SEQ ID NO: 1

1 Ser Glu Thr Gln Ala **Asn** Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp
21 Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp
41 Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val **Cys** Ala
61 Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
81 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly **Asn** Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu
101 Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser **Asn** His
121 Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Gln Lys Tyr
141 Gln Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Gln Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
161 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Gln Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Gln Gln Ala
181 Ile Gln Leu Leu Gln Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr
201 His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Ser Lys Gln Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Gln
221 **Asn** Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Gln Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
241 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Gln Asp Val Gln Ala Leu **Asn** Ile Ser Val Pro Tyr
261 Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser
281 Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala **Asn**
301 Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Gln His Gly Gln Trp
321 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly
341 Arg Thr Ala Ser Leu Pro Gln Ala Gly Gln Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp
361 Ser Ala Ser Gln Leu Met Gln Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Gln Leu Val Ser
381 Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
401 Ser Phe His Val Gln Leu Cys Arg Gln Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg
421 Asp Leu Gln Gln Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Gln Leu Ile Ala Tyr Ser Gln
441 Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile
461 Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
481 Asn Pro Asp Gln Phe Leu Ala **Asn** Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Gln Leu Tyr Phe Val
501 Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr **Asn** Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe
521 Gln Leu Leu Met Pro **Asn**

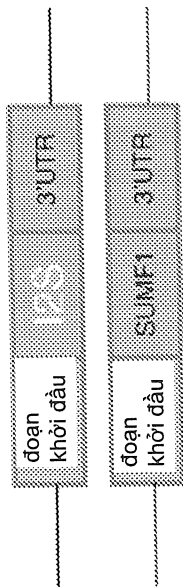
Asn - vị trí đánh dấu của việc glycosyl hóa liên kết đầu N

Cys - vị trí tiêu biểu của việc chuyển hóa xystein

Hình 1

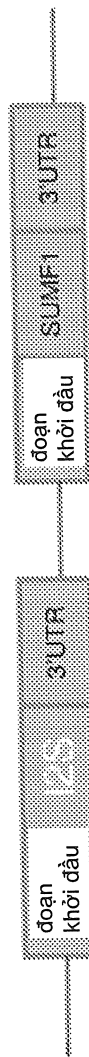
Các lựa chọn cùng biểu hiện I2S và SUMF1

A) các đơn vị cùng biểu hiện trên các vật truyền riêng biệt (cùng chuyển nhiệm hoặc chuyển nhiệm tiếp theo)

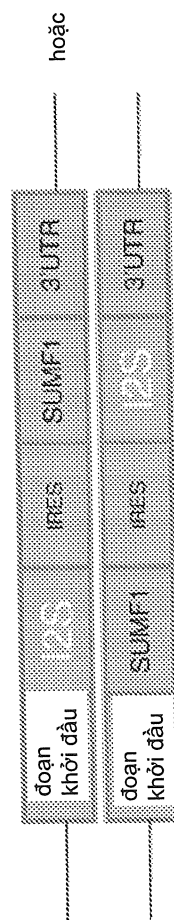


B) các đơn vị biểu hiện trên cùng một vật truyền (một lần chuyển nhiệm)

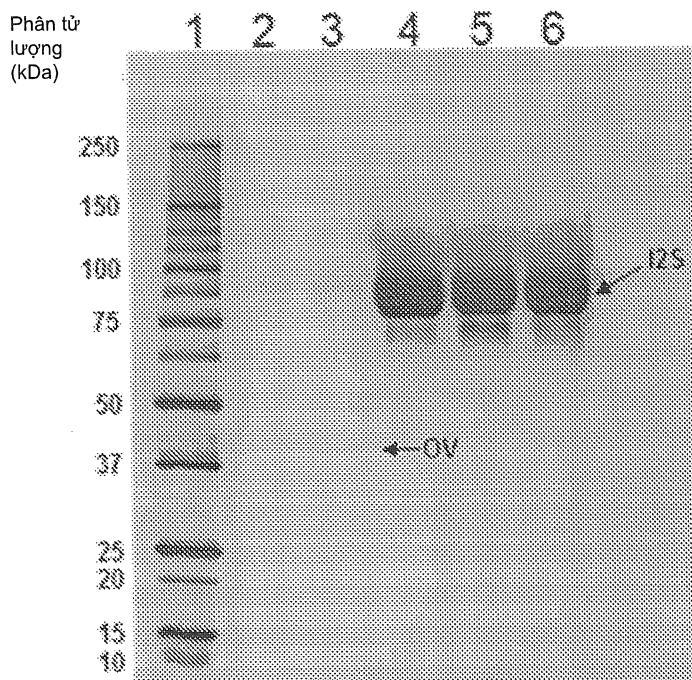
1) xistron riêng biệt



2) *xistron liên kết phiên mã

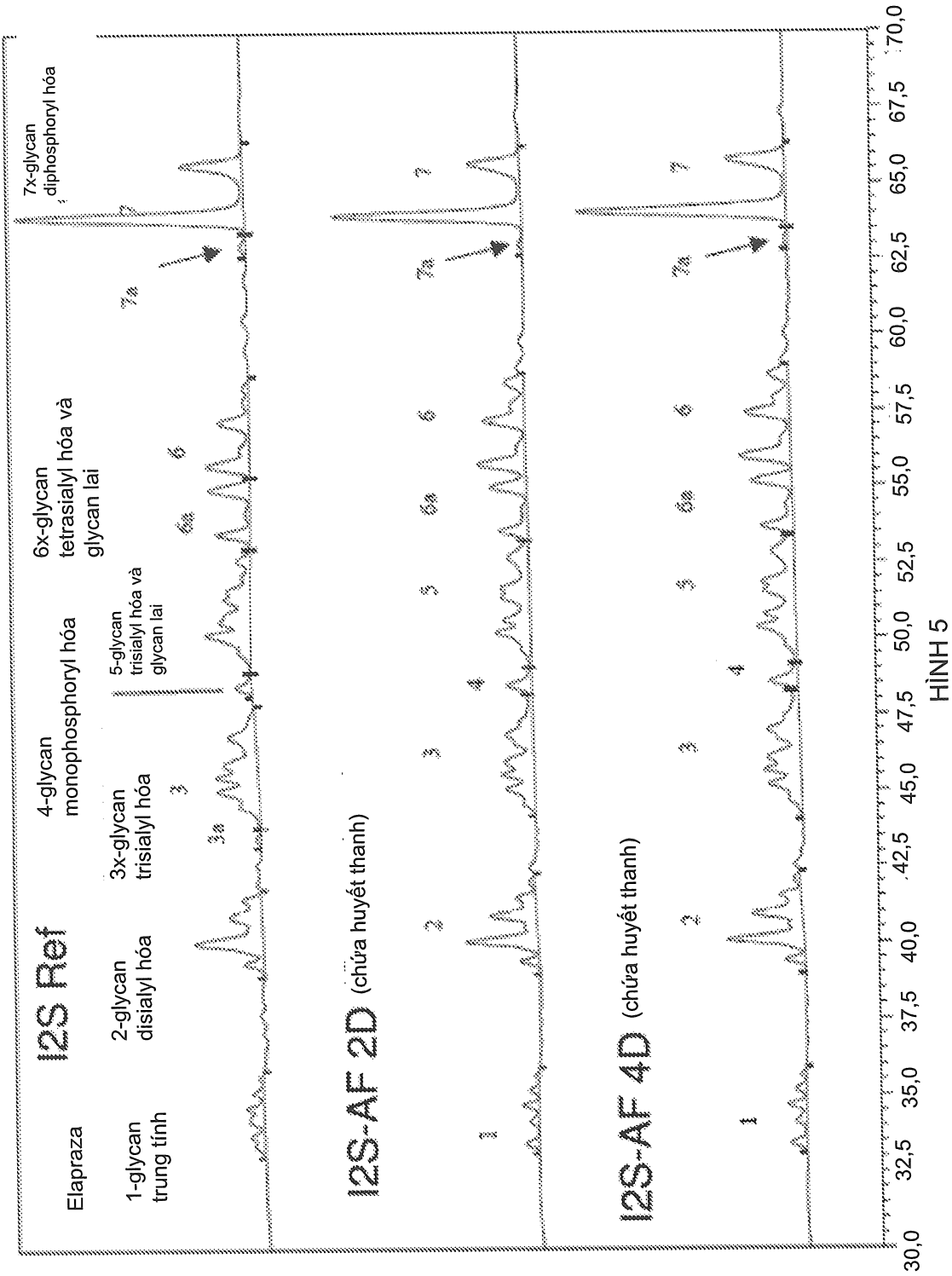


HÌNH 2

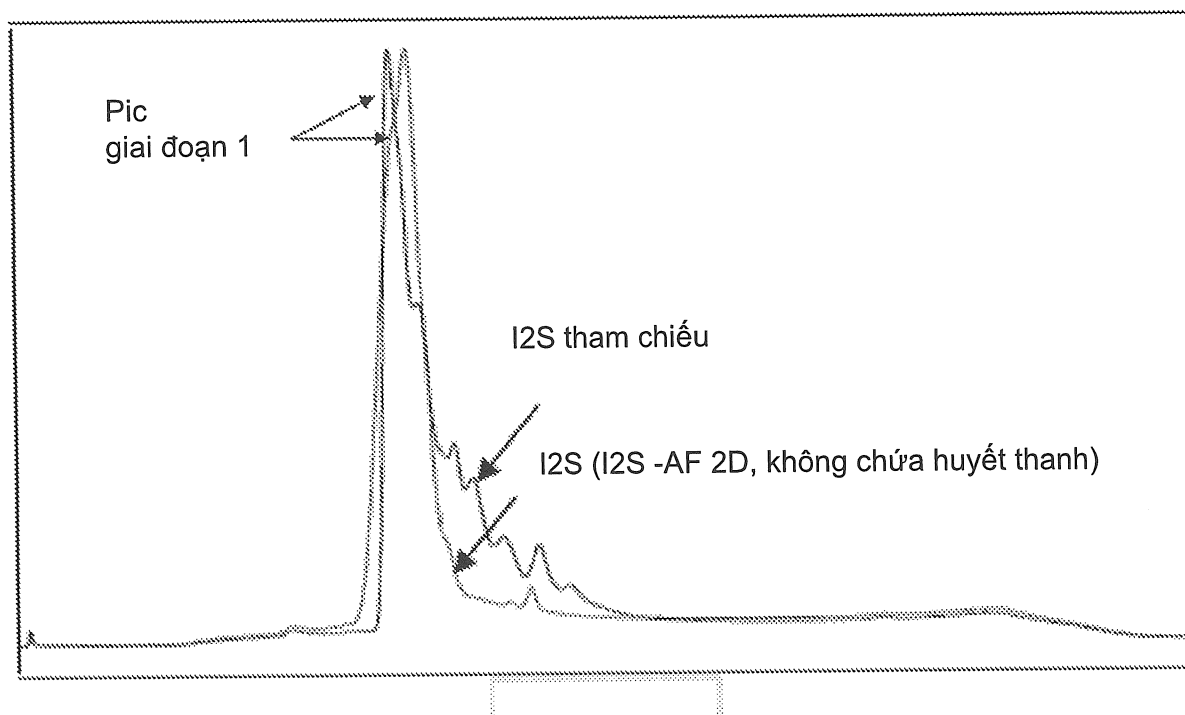


Dải	Mẫu nạp	thể tích nạp	tổng số Microgam
1	Protein Stds	3 µl	
2	đối chứng thử nghiệm #1	20 µl	8 µg
3	đối chứng thử nghiệm #2	20 µl	16 µg
4	chất chuẩn tham chiếu I2S	20 µl	8 µg
5	môi trường không chứa huyết thanh I2S-AF-2D	20 µl	8 µg
6	môi trường không chứa huyết thanh I2S-AF-4D	20 µl	8 µg

HÌNH 3



I2S được tạo ra bằng cách sử dụng giống cây không chứa huyết thanh I2S-AF 2D



Hình 6