

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4459059号  
(P4459059)

(45) 発行日 平成22年4月28日(2010.4.28)

(24) 登録日 平成22年2月19日(2010.2.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K 47/08 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 Z N A Z

A 6 1 K 37/465

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 47/08

請求項の数 43 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-551853 (P2004-551853)  
 (86) (22) 出願日 平成15年11月7日(2003.11.7)  
 (65) 公表番号 特表2006-510356 (P2006-510356A)  
 (43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/035510  
 (87) 国際公開番号 W02004/043373  
 (87) 国際公開日 平成16年5月27日(2004.5.27)  
 審査請求日 平成18年10月31日(2006.10.31)  
 (31) 優先権主張番号 10/290,908  
 (32) 優先日 平成14年11月7日(2002.11.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502170153  
 バイオマリン ファーマシューティカル  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 949  
 49、ノヴァト、デジタル ドライブ  
 105  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100096769  
 弁理士 有原 幸一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前駆体N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ、当該酵素を使用した治療方法、ならびに当該酵素の生産および精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前駆体ヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼを含む組成物であって、前記前駆体ヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼの純度が、総タンパク質に基づいて少なくとも99%またはそれ以上であり、前記純度が逆相HPLC(RP-HPLC)法を使用して測定されたものである、組成物。

【請求項 2】

前記前駆体ヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼの純度が、総タンパク質に基づいて少なくとも99.2%またはそれ以上であり、前記純度が逆相HPLC法を使用して測定されたものである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記前駆体ヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼが、グリコシル化されている、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記純度が99.5%またはそれ以上である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記純度が99.9%またはそれ以上である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

前記前駆体ヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼが、組換え前駆体N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼである、請求項1～5のいずれかに記載

の組成物。

【請求項 7】

前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度が、総タンパク質に基づいて少なくとも 99 % またはそれ以上であり、前記純度がサイズ排除クロマトグラフィ - HPLC (SEC - HPLC) 法を使用して測定されたものである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

前記 SEC - HPLC による純度が、99.5 % またはそれ以上である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 RP - HPLC による純度が 99 % またはそれ以上であり、前記 SEC - HPLC による純度が 99.5 % またはそれ以上である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の組成物と薬学的に許容可能なキャリアとを含む薬学的組成物。

【請求項 11】

塩化ナトリウム溶液と非イオン性界面活性剤とをさらに含む、請求項 10 に記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼが、約 1 ~ 5 mg / mL の濃度で存在する、請求項 10 に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

緩衝液が約 10 ~ 50 mM の濃度のリン酸ナトリウム緩衝液である、請求項 10 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

pH が約 5.8 に維持されている、請求項 13 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

ポリオキシエチレンソルビタンをさらに含む、請求項 10 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記ポリオキシエチレンソルビタンが、ポリオキシエチレンソルビタン 20 または 80 であり、前記ポリオキシエチレンソルビタン 20 または 80 の濃度が、約 0.005 % (重量 / 体積) である、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

少なくとも 99 % またはそれ以上の純度を有する前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの精製方法であって、

(a) 前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む流動物を得るステップと、

(b) 前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを切断することができる前記流動物中のプロテアーゼのタンパク質分解活性を減少させるステップであって、前記減少が前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼに悪影響を与えない、ステップと、

(c) 前記流動物を Cibracon blue dye 相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、

(d) 前記流動物を銅キレート化クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、

(e) 前記流動物をフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、

(f) 前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを回収するステップと

を含む、方法。

【請求項 18】

前記得るステップが、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをコードする

10

20

30

40

50

遺伝子で形質転換した細胞培養物を成長させるステップを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記遺伝子がヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをコードする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巢細胞である、請求項 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 2】

前記得るステップが、前記細胞培養物から流動物を回収するステップをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記得るステップが、前記流動物を約 2 0 倍に濃縮するステップをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記減少ステップが、流動物の pH を 8 . 0 またはそれ以下に調整するステップを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記減少ステップが、流動物の pH を約 4 . 8 ~ 5 . 5 に調整するステップを含む、請求項 2 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 6】

前記減少ステップが、流動物の pH を約 4 . 8 ~ 5 . 2 に調整するステップを含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

ステップ ( c ) が、前記流動物を Cibracon blue dye 相互作用クロマトグラフィカラムに通過させるステップを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 Cibracon blue dye 相互作用クロマトグラフィカラムが、Blue Sepharose 6 Fast Flow カラムである、請求項 2 7 に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

ステップ ( d ) が、前記流動物を銅キレート化クロマトグラフィカラムに通過させるステップを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記銅キレート化クロマトグラフィカラムが、Chelating Sepharose Fast Flow カラムである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

ステップ ( e ) が、前記流動物をフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィカラムに通過させるステップを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

前記フェニル疎水性相互作用クロマトグラフィカラムが、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub カラムである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

ステップ ( c )、( d ) および ( e ) の時間的な順序が、ステップ ( c )、ステップ ( d )、およびステップ ( e ) である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記回収ステップが前記流動物のダイアフィルトレーションを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 3 5】

50

前記回収ステップが、DNAを除去するための前記流動物の濾過を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項36】

前記回収ステップが、ウイルスを除去するための前記流動物の濾過を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項37】

前記濾過が、前記流動物を0.2 μmフィルターに通過させるステップを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項38】

回収された前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度が、少なくとも99%またはそれ以上である、請求項17に記載の方法。 10

【請求項39】

前記純度が逆相HPLC法によりを使用して測定されたものである、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記流動物がDEAE Sepharose樹脂と接触しない、請求項17に記載の方法。

【請求項41】

請求項17に記載の方法を使用して精製された、純度が少なくとも99%またはそれ以上の前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む組成物。

【請求項42】

少なくとも99%またはそれ以上の純度を有する前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼと、約0.002% ~ 約0.008% (重量/体積) の範囲の濃度のポリオキシエチレンソルビタンとを含む薬学的組成物。 20

【請求項43】

前記ポリオキシエチレンソルビタンが、0.005%の濃度(重量/体積)のポリオキシエチレンソルビタン80である、請求項42に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2002年11月7日提出の米国特許出願番号10/290,908号(その全体が本明細書中 30  
で参考として組み込まれる)の一部継続出願である。

【0002】

本発明は、臨床医学分野、生化学分野、および分子生物学分野に属する。本発明は、VI型ムコ多糖体症の治療薬および治療方法ならびにこのような治療薬の生産および生産のための精製手順を特徴とする。

【背景技術】

【0003】

MPS VI (マロトー - ラミー症候群) は、罹患患者が酵素N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ (ASB) を欠くリソソーム蓄積症である。この酵素は、グリコサミノグリカン (GAG) デルマタン硫酸の硫酸塩部分を代謝する (Neufeld, et al., 「The mucopolysaccharidoses」 The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver et al., New York: McGraw-Hill, 1989, p. 1565-1587)。酵素の非存在下では、デルマタン硫酸の段階的分解が遮断され、広範な組織のリソソーム細胞内に基質が蓄積する。蓄積により複数の器官および組織で疾患が進行し、これは、乳児が正常に誕生するようであるが、通常思春期前に死亡することに関連する。通常、6 ~ 24月齢で児童の成長遅延の進行、肝臓および脾臓の肥大、骨の奇形、粗大化顔貌 (coarse facial features)、上気道閉塞、および関節奇形を示す場合、MPS VI と診断される。MPS VI 児童は、進行性の角膜混濁、交通性水頭症、または心疾患を発症し得る。通常、呼吸器感染または心疾患で死亡する。MPS I と異なり、MPS VI は、典型的に、精神状態の進行性障害と関連しないが、物理的制約が学習および発達に影響を与え得る。ほとんどのMPS VI 患 40 50

者は、通常は十代までに死亡する重症形態を有するが、数十年間生存することができる疾患の重症度の低い形態を有する罹患患者が説明されている。

【 0 0 0 4 】

いくつかの刊行物では、M P S V I の発症率を推測している。Lowry et al (Lowry, et al., Human Genet 85:389-390(1990)) が発表した1990年に行われたブリティッシュコロンビア州で1952年と1986年との間に誕生した全新生児の調査での発症率はちょうど1/1,300,000と推定された。オーストラリアでの1980年～1996年の出生時の調査(Meikle et al., JAMA 281(3):249-54)では18人の患者が認められ、発症率は1/248,000であった。北アイルランドでの調査(Nelson, et al., Hum. Genet. 101:355-358(1997))では、発症率は1/840,000と推定された。最後に、オランダにおける1970年～1996年の調査では、出生率は、100,000人に対し0.24人と算出された(Poorthuis, et al., Hum. Genet. 105:151-156(1999))。これらの調査に基づいて、米国における全てのこの症候群型と診断された患者は50人から300人の間と推定される。

【 0 0 0 5 】

M P S V I の満足の行く治療は存在しないが、少数の患者では骨髄移植 ( B M T : bone marrow transplantation ) が有益であった ( Krivit, et al., N. Engl. J. Med. 311(25):1606-11(1984); Krivit, et al., Int. Pediat. 7:47-52(1992) )。B M T は、適切なドナーの不足によって普遍的に利用できず、これが実質的な罹患率および死亡率に関連する。The European Group for Bone Marrow Transplantationの報告では、リソソーム障害における63の移植症例の移植関連死亡率は10% ( H L A 同一 ) ～ 20 ～ 25% ( H L A ミスマッチ ) であった ( Hoogerbrugge, et al., Lancet 345:1398-1402(1995) )。B M T 以外のほとんどの患者はその唯一の治療形態として特定の問題についての対症療法を受ける。本発明の目的は、組換えヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) を使用した酵素代償療法を提供することにある。r h A S B によるヒトの治療は試みられていない。同様に、許容可能な臨床投薬量または医学的処方物は提供されていない。ネコ M P S V I モデルにおけるいくつかの酵素置換試験を行った。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、前駆体形態の高度に精製された N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む組成物の生産、精製、および使用を含む。前駆体形態の D N A およびコードされたアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 1 および 2 に記載する。配列番号 2 のシグナル配列は、配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 38 と推定され、組換え生産により配列番号 2 のアミノ酸残基 39 または 40 のいずれかから開始される産物が得られた。

【 0 0 0 7 】

第 1 の態様では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) の欠損に全部または一部起因する疾患の新規の治療法を特徴とする。本方法は、有効量の薬学的組成物をこのような治療を必要とする被験体に投与するステップを含む。好ましい実施形態では、薬学的組成物は、前駆体形態の高度に精製された N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを単独または薬学的に適切なキャリアと組み合わせて含む。被験体は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ欠損に全部または一部起因する疾患を罹患している。他の実施形態では、本方法は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) またはその生物活性変異体もしくはアナログの全部または一部をコードする核酸のインビボでの 1 つまたは複数の宿主細胞への導入を特徴とする。好ましい実施形態は、治療すべき生物 ( 好ましくは哺乳動物またはヒト ) に必要な投薬量を病徴を有効に改善するように至適化することを含む。好ましい実施形態では、疾患は V I 型 ムコ多糖体症 ( M P S V I ) またはマロトー - ラミー症候群である。

【 0 0 0 8 】

本発明の第 1 の態様は、特に、治療有効量のヒト A S B、好ましくは組換えヒト A S B の投与による、A S B 活性の欠損に全部または一部起因する疾患を罹患したヒトの治療方

法を提供する。したがって、本発明は、A S B 活性欠損症の治療のための薬物の調製におけるヒト A S B の使用および A S B 活性の欠損症の治療で使用するためのヒト A S B を含む薬学的組成物を意図する。A S B 活性の欠損は、例えば、正常な A S B 活性レベルと比較して 50 % または以下、25 % またはそれ以下、または 10 % またはそれ以下の活性レベルとして認められ、ムコ多糖体症（例えば、V I 型ムコ多糖体症（M P S V I）またはマロトー - ラミー症候群）として現れ得る。治療有効量は、ヒト患者が有利な結果を得るのに十分な量であり、好ましくは、以下の任意の 1 つが改善する。関節可動性、痛み、または関節の堅さ（主観的または客観的のいずれか）；運動耐容能(exercise tolerance) または運動耐久力(exercise endurance)（例えば、歩行能力または上り能力によって測定）；肺機能（例えば、F V C、F E V<sub>1</sub>、または F E T によって測定）；視力；または日常生活動作（例えば、座っている状態から立ち上がる能力、衣類の出し入れ、または小物の拾い上げによって測定）。ヒト A S B を、好ましくは、本明細書中に記載の高度に精製された組換え調製物として投与する。好ましい調製物は、逆相 H P L C で測定したところ、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.2 %、99.5 %、99.6 %、99.7 %、99.8 %、または 99.9 % を越える純度の r h A S B を含む。好ましい調製物はまた、純度の高い前駆体形態の A S B を含み、その結果クーマシー染色 S D S - P A G E でプロセシング形態の A S B は検出されない。より好ましくは、前駆体形態の A S B の純度は、サイズ排除クロマトグラフィ（（S E C）- H P L C）で測定したところ、95 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.2 %、99.5 %、99.6 %、99.7 %、99.8 %、または 99.9 % を越える。ヒト A S B は、好ましくはまた、本明細書中に記載の界面活性剤または非イオン性界面活性剤を使用して処方される（必要に応じて任意に、0.001 % のポリオキシエチレンソルビタン 20 および 80 使用した処方物を除外する）。

#### 【0009】

1 m g / k g / 週末満（例えば、0.2 m g / k g / 週）の用量の r h A S B の投与は、有利な効果が得られることを見いだされた。本発明は、少なくとも 0.1 m g / k g、0.2 m g / k g、0.5 m g / k g、0.75 m g / k g、1 m g / k g、または 1.5 m g / k g / 週の用量を意図し、2 m g / k g、4 m g / k g、5 m g / k g / 週またはそれ以上の範囲であり得る。好ましい用量は、1 m g / k g / 週である。このような用量を 1 週間に 1 回送達させることが好ましいが、選択的により頻繁な（1 週間に 2 回または毎日など）送達のために等分することができる。等しい投薬量を送達させる種々の非経口または経口投与経路（経口、経皮、経粘膜、肺内（エアゾール化が含まれる）、筋肉内、皮下、または静脈内が含まれる）が意図される。関節または C S F へのボーラス注射または直接的注入による投与が特に意図される（鞘内、大脳内、脳室内、腰椎穿刺経路、または大槽など）。このような鞘内投与達成のための種々の手段が当分野で公知である（ポンプ、リザーバ、シャント、または移植片が含まれる）。好ましくは、用量を、1、2、または 4 時間、最も好ましくは 4 時間継続する静脈内注入を介して送達させるが、静脈内ボーラスによって導入させることもできる。

#### 【0010】

ヒト被験体の他の A S B 活性増加手段（患者の外因性または内因性 A S B 発現を一過性または恒久的に増大させる遺伝子治療が含まれる）も意図される。当分野で公知の種々の手段（ウイルスベクター、相同組換え、または直接 D N A 注入が含まれる）によって、外因性 h A S B 遺伝子または内因性 h A S B 遺伝子の発現を増大させるプロモーターの送達が可能である。

#### 【0011】

第 2 の態様では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ（A S B）の欠損に全部または一部起因する疾患の治療に有用な N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ（A S B）、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを含む新規の薬学的組成物を特徴とする。好ましい実施形態では、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼは前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファ

ターゼである。このような組成物は、非経口、局所、鼻腔内、吸入、または経口投与などの多数の方法における投与に適切であり得る。N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) 欠損の影響を受ける細胞にインビボで投与することができるN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) の全部または一部をコードする核酸配列を特徴とする実施形態は態様の範囲内である。

#### 【 0 0 1 2 】

第3の態様では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量でのN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの生産方法 を特徴とする。広範な実施形態では、本方法は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) またはその生物活性変異体もしくはアナログの全部または一部をコードする c D N A でその発現に適切な細胞をトランスフェクトするステップを含む。好ましい実施形態では、不変の培養または連続培養、または灌流培養で細胞を成長させる。別の実施形態では、G 4 1 8 を欠く培地で細胞を成長させる。いくつかの実施形態では、完全なN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、好ましくはヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) をコードする c D N A を使用する。しかし、他の実施形態では、その生物活性フラグメントまたは変異体をコードする c D N A を使用することができる。詳細には、酵素の生物活性を保持または強化しながら1つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができる。別の好ましい実施形態では、発現ベクターを使用して、c D N A をその発現に適切な細胞または細胞システムに移行する。1つの特に好ましい実施形態では、c D N A を、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞 ( C H O - K 1 細胞システムなど) にトランスフェクトする。さらに他の好ましい実施形態では、生産手順は、以下のステップを含む。( a ) ヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの全部または生物活性フラグメントもしくは変異体をコードするD N A でトランスフェクトした細胞を適切な成長培地中で適切な密度まで成長させるステップと、( b ) トランスフェクトした細胞をバイオリアクターに導入するステップと、( c ) 前記バイオリアクターに適切な成長培地を供給するステップと、( d ) 酵素を含む培地からトランスフェクトされた細胞を分離するステップ。

#### 【 0 0 1 3 】

第4の態様では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) を生産する能力を特徴とするトランスフェクトした細胞システムを提供する。好ましい実施形態では、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼは、前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼである。好ましい実施形態では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを安定且つ確実に生産するC H O - K 1 細胞システムなどの組換えC H O 細胞システムを特徴とする。C S L 4 S - 3 4 2 と呼ばれるトランスジェニックC H O - K 1 細胞システムが特に好ましい。いくつかの好ましい実施形態では、トランスジェニック細胞システムは、1つまたは複数の発現構築物のコピーを含む。好ましくは、トランスジェニック細胞システムは、約10またはそれ以上の発現構築物のコピーを含む。さらにより好ましい実施形態では、細胞システムは、少なくとも約20 ~ 40  $\mu$  g / 10<sup>7</sup>細胞 / 日の量で組換えN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを発現する。

#### 【 0 0 1 4 】

第5の態様では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの生産に適切な新規のベクターを提供する。

#### 【 0 0 1 5 】

第6の態様では、本発明は、本発明の方法にしたがって生産され、それにより酵素治療で 사용할 ことができる量で存在する、新規のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを提

供する。本発明のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) の比活性は、好ましくは20 ~ 90単位 / m g タンパク質、より好ましくは約50単位 / m g タンパク質を越える範囲である。好ましい実施形態では、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼは、高度に精製された前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼである。

#### 【0016】

第7の実施形態では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの新規の精製方法の特徴とする。第1の実施形態によれば、トランスフェクトした細胞塊を成長させ、これを除去し、組換え酵素を放出させる。カラム汚染を防止するために、外因性物質を、通常、粗バルクから分離すべきである。好ましくは、組換え酵素を含む成長培地に対して限外濾過ステップを行う。別の好ましい実施形態では、前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの精製方法は、( a ) 前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む流動物を得るステップと、( b ) 前記前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを切断することができる前記流動物中のプロテアーゼのタンパク質分解活性を減少させるステップであって、前記減少が前記前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼに悪影響を与えない、ステップと、( c ) 前記流動物をCibacron blue dye相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( d ) 前記流動物を銅キレート化クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( e ) 前記流動物をフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( f ) 前記前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを回収するステップとを含む。好ましくは、ステップ( c )、( d )、および( e )を連続的に実施することができる。当業者は、1つまたは複数のクロマトグラフィステップを省略または置換することができること、また、クロマトグラフィステップの順序を本発明の範囲内で変化させることができることを容易に認識する。他の好ましい実施形態では、最後のクロマトグラフィカラム由来の溶離物に対して限外濾過 / ダイアフィルトレーションを行い、任意の残存ウイルスを除去するための適切なステップを行う。最後に、所望ならば、適切な滅菌ステップを行うことができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0017】

本発明は、前駆体形態の高度に精製されたN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む組成物の生産、精製、および使用を含む。前駆体形態のN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度は、逆相HPLC法によって決定したところ、総タンパク質の少なくとも95、96、97、または98%またはそれ以上である。好ましくは、純度は、少なくとも99%またはそれ以上である。より好ましくは、純度は、少なくとも99.1、99.2、99.3、または99.4%またはそれ以上である。さらにより好ましくは、純度は、少なくとも99.5、99.6、99.7、または99.8%またはそれ以上である。なおさらにより好ましくは、純度は、少なくとも99.9%またはそれ以上である。前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度は、逆相HPLC法を使用して測定される(実施例9を参照のこと)。前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度は、逆相HPLC法によって検出可能な本質的にいかなる夾雑細胞タンパク質または分解、成熟、またはプロセッシングされたN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼも含まない組成物によるものである。全ての純度は、逆相HPLC法によって決定された総タンパク質に基づく。本明細書中に開示の精製プロセスを使用して得ることができる連続的に反復可能な高い純度により、治療毎(例えば、毎週)に投与される高純度rhASB調製物での長期慢性治療を必要とするこれらの患者を治療することが可能である。したがって、本発明は、長期間にわたる(例えば、12週間、24週間、48週間、96週間、またはそれ以上)このような高純度の前駆体rhASBの投与を意図する。

#### 【0018】



第1の態様では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) の欠損に全部または一部起因する疾患の新規の治療方法の特徴とする。1つの実施形態では、本方法は、組換えN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) 、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの単独または薬学的に適切なキャリアとの組み合わせの投与を特徴とする。他の実施形態では、本方法は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) またはその生物活性変異体の全部または一部をコードする核酸のインピボでの1つまたは複数の宿主細胞への導入を特徴とする。好ましい実施形態は、治療すべき生物 ( 好ましくは哺乳動物またはヒト ) に必要な投薬量を、病徴を有効に改善するように至適化することを含む。好ましい実施形態では、疾患はV I 型ムコ多糖体症 ( M P S V I ) 、マロトー - ラミー症候群である。

10

#### 【 0 0 1 9 】

前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度は、組成物が前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを投与された被験体によって免疫反応またはアレルギー反応を生じ得るいかなる夾雑細胞タンパク質も本質的に含まないことによるものである。被験体に投与された場合に組成物がいかなる免疫反応またはアレルギー反応も生じない場合、組成物は本質的にこのような夾雑宿主細胞タンパク質を含まない。前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼが高純度であることは、薬学的組成物中に存在する夾雑物に対する被験体による免疫反応またはアレルギー反応の回避に重要である。これは、前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼが精製される細胞のタンパク質で特に真である。組換え前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼがチャイニーズハムスター卵巣細胞から発現および精製される場合、チャイニーズハムスター卵巣タンパク質は、被験体の免疫反応またはアレルギー反応 ( 例えば、蕁麻疹 ) を生じさせ得る。この反応型の唯一の回避手段は、前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼがこのような反応を引き起こすのに十分な量の夾雑チャイニーズハムスター卵巣タンパク質を含まないように確実に十分に純粋であることである。被験体にはM P S V I を罹患している患者が含まれ、それによりすでに免疫力が低下しているので、薬学的組成物の純度は特に重要である。

20

#### 【 0 0 2 0 】

組成物中でプロセシング形態または分解形態が微量であるような前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( A S B ) の純度も好ましい。宿主細胞中に存在するプロテアーゼは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをより低分子量の形態に分解する。これらいくつかの形態は酵素的に活性でもあり得る一方で、前駆体形態は細胞取り込みおよびリソソームターゲティングに好ましいので、最終調製物中により大量の非プロセシング前駆体A S B を含むことが望ましい。さらに、製剤中の分解形態のA S B はまたA S B 自体の抗体の発生数または量をより多くし得るので、患者が長期治療を必要とする場合などに全く望ましくない。本明細書中に記載の灌流精製プロセスにより、S D S - P A G E と、R P H P L C と、S E C - H P L C との組み合わせによってアッセイしたところ、本質的に夾雑宿主細胞タンパク質またはプロセシング / 分解形態のA S B を含まない高純度の調製物が得られる。ヒトに投与した場合、本プロセスによって生産された産物の半減期はより長いようである。

30

40

#### 【 0 0 2 1 】

マロトー - ラミー症候群としても公知のM P S V I の治療のために組換えヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) を示す。好ましい実施形態によれば、1 m g / k g ( 約 5 0 U / k g ) の初回投与量を、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの欠損症を罹患している患者に投与する。好ましくは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを、注射によって毎週投与する。他の好ましい実施形態によれば、少なくとも50%の尿中グリコサミノグリカン排出量の減少を示さない患者には、初回投与の約3ヶ月以内に投薬量を2 m g / k g ( 約 1 0 0 単位 / k g ) に変更する。好ましくは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) 、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを、好ましくは有意な疾

50

患の臨床症状が持続する限り、1週間に1回約4時間にわたり静脈内に投与する。また、好ましくは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) を、最初に約 3 0 c c / 時間の生理食塩水注入から開始する橈側皮静脈または他の適切な静脈に留置した静脈内カテーテルによって投与する。さらに、好ましくは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) を、通常の生理食塩水で約 2 5 0 c c に希釈する。

#### 【 0 0 2 2 】

第2の態様では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの欠損症の治療に有用なヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( r h A S B ) 、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを含む新規の薬学的組成物を特徴とする。上記の好ましい実施形態に加えて、組換え酵素を多数の方法（非経口、局所、鼻腔内、吸入、または経口投与など）で投与することができる。本発明の別の態様は、固体、半固体、もしくは液体、または摂取可能なカプセル ( ingestable capsule ) であり得る薬学的に許容可能なキャリアを使用した酵素の処方による酵素の投与を提供することである。薬学的組成物の例には、錠剤、鼻腔用ドロップなどのドロップ、軟膏、ゼリー、クリーム、および懸濁液などの局所投与用組成物、吸入用エアゾール、鼻腔内スプレー、リポソームが含まれる。通常、組成物に対して 0 . 0 5 重量%と 9 9 重量%との間または 0 . 5 重量%と 9 9 重量%との間（例えば、注射を意図する組成物に対して 0 . 5 重量%と 2 0 重量%との間および経口投与を意図する組成物に対して 0 . 1 重量%と 5 0 重量%との間）の組換え酵素を含む。

#### 【 0 0 2 3 】

治療酵素を含む経口投与用のこの単位投与形態中に薬学的組成物を生産するために、酵素を、固体粉末キャリア（例えば、乳糖、サッカロース、ソルビトール、マンニトール、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、アミロペクチンなどのデンプン）、コンブ粉末もしくは柑橘類パルプ粉末、セルロース誘導体、またはゼラチンと混合することができ、ステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸カルシウムなどの潤滑剤またはCarbowaxもしくは他のポリエチレングリコールワックスも含まれ、打錠して錠剤または糖剤のコアを形成することができる。糖剤が必要な場合、コアを、例えば、アラビアガム、タルク、および/または二酸化チタンを含み得る濃縮糖溶液または揮発性有機溶媒もしくは有機溶媒混合物に溶解した被膜剤でコートすることができる。例えば、活性物質の異なる内容物を区別するためにこれらのコーティングに色素を添加することができる。ゼラチンおよび例えば可塑剤としてのグリセロールからなる軟ゼラチンカプセルまたは類似の密封カプセルの組成物のために、活性物質を、Carbowaxまたは適切なオイル（例えば、ゴマ油、オリーブ油、またはラッカセイ油）と混合することができる。硬ゼラチンカプセルは、乳糖、サッカロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン（ジャガイモデンプン、コーンスターチ、またはアミロペクチンなど）、セルロース誘導体、またはゼラチンなどのなどの固体粉末キャリアを含む活性物質の顆粒を含むことができ、潤滑剤としてステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸も含み得る。

#### 【 0 0 2 4 】

本発明の治療酵素を、1回の注射もしくはポンプ注入のいずれかによる皮下、筋肉内、または静脈内注射または徐放性皮下移植片などによって非経口投与することもでき、治療酵素を吸入によって投与することができる。皮下、筋肉内、および静脈内注射では、治療酵素（有効成分）を、液体キャリア賦形剤に溶解または分散させることができる。非経口投与のために、活性材料を、許容可能な賦形剤（好ましくは、ピーナッツ油、綿実油などの種々の植物油）と適切に混合することができる。ソルケタール ( solketal ) 、グリセロール、ホルマル、および水性非経口処方物を使用した有機組成物などの他の非経口賦形剤も使用することができる。

#### 【 0 0 2 5 】

注射による非経口適用のために、組成物は、本発明の活性な酸の水溶性の薬学的に許容可能な塩の水溶液を、望ましくは 0 . 5 ~ 1 0 % の濃度で含むことができ、必要に応じて

任意に、水溶液中に安定剤および／または緩衝液も含み得る。溶液の投薬単位をアンプルに密封することが有利であり得る。

【 0 0 2 6 】

治療酵素を皮下移植片の形態で投与する場合、化合物を当業者に公知のゆっくりと分散する物質に懸濁または溶解するか、浸透圧ポンプなどの一定駆動力の使用によって活性材料を徐放するデバイスで投与する。このような場合、長期投与が可能である。

【 0 0 2 7 】

局所適用のために、薬学的組成物は、軟膏、細胞、懸濁液、またはクリームなどの形態が適切である。活性物質の量は、例えば、活性物質の 0 . 0 5 重量 % と 2 0 重量 % との間で変化し得る。このような局所投与用薬学的組成物を、公知の様式における活性物質とイソプロパノール、グリセロール、パラフィン、ステアリルアルコール、ポリエチレングリコールなどの公知のキャリア材料との混合によって調製することができる。薬学的に許容可能なキャリアには、公知の化学吸収促進剤も含まれ得る。吸収促進剤の例は、例えば、ジメチルアセトアミド（米国特許第3,472,931号）、トリクロロエタノール、もしくはトリフルオロエタノール（米国特許第3,891,757号）、一定のアルコール、およびその混合物（英国特許第1,001,949号）である。非損傷皮膚への局所投与のためのキャリア材料は、4 0 ~ 7 0 % ( v / v ) のイソプロパノールおよび 0 ~ 6 0 % ( v / v ) のグリセロール（存在する場合、希釈剤の不活性成分を総溶媒体積の 4 0 % を越えないようにバランスをとる）を含む溶媒からなるキャリア材料を開示する、英国特許出願第1,464,975号にも記載されている。

【 0 0 2 8 】

薬学的組成物を含む治療酵素を投与する投薬量は広範囲で変化させることができ、例えば、疾患の重症度、患者の年齢などの種々の要因に依存し、個別に調整しなければならない。1日に投与することができる治療酵素量のおおよその範囲は、約 0 . 1 m g ~ 約 2 0 0 0 m g または約 1 m g ~ 約 2 0 0 0 m g であり得る。

【 0 0 2 9 】

治療酵素を含む薬学的組成物を、単回投与単位または複数回の投与単位のいずれかとしてこれらの範囲内で用量が得られるように適切に処方することができる。治療酵素の含有に加えて、本発明の処方物は、組成物中の治療酵素によって触媒される反応のための1つまたは複数の基質または補因子を含み得る。治療酵素を含む薬学的組成物は、1つを超える治療酵素も含み得る。同様に、治療酵素は、別の部分（例えば、P E G）に結合した抱合体形態(conjugate form)であり得る。さらに、治療酵素は、目的の組織、器官、またはオルガネラへの送達を補助するための1つまたは複数のターゲティング部分または輸送ペプチドを含み得る。

【 0 0 3 0 】

本発明の方法で使用される組換え酵素および組成物を、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログをコードする核酸での患者細胞の形質転換によって投与することもできる。このようなコードする核酸配列を、治療すべき患者の細胞への形質転換のためのベクターに組み込むことができる。このようなベクターの好ましい実施形態を本明細書中に記載する。被験体の染色体に組み込むか（例えば、レトロウイルスベクター）、宿主細胞中で自律複製するようにベクターをデザインすることができる。酵素の持続的または調節された発現が得られるようにコードするN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼのヌクレオチド配列を含むベクターをデザインすることができる。さらに、細胞ゲノムに安定に組み込まれるか一過性にのみ存在するように酵素をコードする遺伝子ベクターをデザインすることができる。従来の一般的な遺伝子治療の方法を、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをコードするポリヌクレオチド配列に適用することができる。従来の遺伝子治療技術の概説を、Friedman, Science 244:1275-1281(1989); Ledley, J. Inherit. Aletab. Dis. 13:587-616(1990); and, Tososhev, et al., Curr. Opinions Biotech. 1:55-61(1990)に見いだすことができる。

## 【 0 0 3 1 】

組換え酵素の特に好ましい投与方法は、静脈内である。特に好ましい組成物は、組換え N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ、通常の生理食塩水、pH を約 5 ~ 7 に維持するためのリン酸緩衝液、およびヒトアルブミンを含む。組成物は、さらに、安定性を改善し、保存期間を延長するためのポリソルベート 20 または 80 ( Tween-20 または Tween-80 ) などのポリオキシエチレンソルビタンを含み得る。あるいは、組成物は、当分野で公知の任意の界面活性剤または非イオン性界面活性剤 ( ポリオキシエチレンソルビタン 40 または 60 ; ポリオキシエチレン脂肪酸エステル ; ポリオキシエチレンソルビタンモノイソステアレート ; ポロクサマー 18 または ポロクサマー 407 などのポロクサマー ; オクトキシノール - 9 または オクトキシノール 40 が含まれるが、これらに限定されない ) を含み得る。

10

## 【 0 0 3 2 】

好ましくは、界面活性剤または非イオン性界面活性剤は、少なくとも 0 . 0 0 0 1 %、少なくとも 0 . 0 0 0 5 %、少なくとも 0 . 0 0 1 %、0 . 0 0 2 %、0 . 0 0 3 %、0 . 0 0 4 %、または 0 . 0 0 5 % ( w / v ) の濃度で存在する。好ましくは、濃度は、所望の安定性を達成するために必要な最低濃度であるが、0 . 0 0 5 %、0 . 0 0 6 %、0 . 0 0 7 %、0 . 0 0 8 %、0 . 0 0 9 %、0 . 0 1 %、または 0 . 0 2 % ( w / v ) までであり得る。最も好ましくは、組成物は、0 . 0 0 5 % ± 0 . 0 0 3 % ( 例えば、0 . 0 0 2 % ~ 0 . 0 0 8 % ) の濃度のポリソルベートを含む。これらの組成物の成分を、好ましくは以下の量で提供することができる。

20

## 【 0 0 3 3 】

N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ

1 ~ 5 m g / m l または 5 0 ~ 2 5 0 単位 / m l

塩化ナトリウム溶液

( 1 V バッグ中に 1 5 0 m M、総体積 5 0 ~ 2 5 0 c c

)

リン酸ナトリウム緩衝液

1 0 ~ 1 0 0 m M ( p H 5 . 8 ) ( 好ましくは 1 0 m M

)

ヒトアルブミン ( 選択的 )

1 m g / m L

Tween-20 または Tween-80

0 . 0 0 1 % ~ 0 . 0 0 5 % ( w / v )

## 【 0 0 3 4 】

好ましい実施形態では、ASB を、150 mM の NaCl、10 mM の NaPO<sub>4</sub> ( pH 5 . 8 )、0 . 0 0 5 % ポリソルベート 80 中に 1 m g / m L で処方する。

30

## 【 0 0 3 5 】

第 3 の態様では、本発明は、酵素治療で使用する量での N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( ASB )、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの生産方法を特徴とする。広範な実施形態では、本方法は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( ASB ) またはその生物活性変異体もしくはアナログの全部または一部をコードする cDNA でその発現に適切な細胞をトランスフェクトするステップを含む。いくつかの実施形態では、完全な N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( ASB )、好ましくはヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ ( ASB ) をコードする cDNA を使用する。しかし、他の実施形態では、その生物活性フラグメントまたは変異体をコードする cDNA を使用することができる。詳細には、酵素の生物活性を保持または強化しながら 1 つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができる。

40

## 【 0 0 3 6 】

他の好ましい実施形態では、発現ベクターを使用して、cDNA をその発現に適切な細胞または細胞系統に導入する。1 つの特に好ましい実施形態では、cDNA を、チャイニーズハムスター卵巣細胞 ( CHO - K1 細胞系統など ) にトランスフェクトする。さらに他の好ましい実施形態では、生産手順は、以下のステップを含む。( a ) ヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルフェートの全部または生物活性フラグメントもしくは変異体

50

をコードするDNAでトランスフェクトした細胞を適切な成長培地中で適切な密度まで成長させるステップと、(b)トランスフェクトした細胞をバイオリアクターに導入するステップと、(c)前記バイオリアクターに適切な成長培地を供給するステップと、(d)組換え酵素を含む培地を回収するステップと、(e)回収培地からトランスフェクトした細胞を実質的に除去するステップ。

#### 【0037】

トランスフェクトした細胞の成長に適切な培地は、L-グルタミン、グルコース、ヒボキサンチン/チミジンを補足し、選択的にG418を含むか含まないJRH Excell 302培地である。好ましい培地では、JRH Excell 302培地に、葉酸、セリン、アスパラギンをさらに補足するが、培地中にG418は存在しない。G418を補足しているが、葉酸、セリン、およびアスパラギンを補足していない培地の使用と比較して、細胞の培養のためのこの好ましい培地の使用により、より純度の高い前駆体rhASBが得られる(図6のレーン2を参照のこと)。10~40mg/mlの活性酵素が得られる約 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞密度を達成するためにこのような培地中で細胞を培養することが好ましい。さらに、トランスフェクトされた細胞をバイオリアクター中で約5~15日間成長させることが好ましい。より好ましくは、約9日間である。好ましくは、トランスフェクトした細胞を、最大35日継続する回収しながらの(with collections)灌流ベースのプロセスを使用してバイオリアクター中で成長させる。より好ましくは、トランスフェクトした細胞を、最大(up to)45日継続する回収しながらの灌流ベースのプロセスを使用してバイオリアクター中で成長させる。さらにより好ましくは、トランスフェクトした細胞を、最大60日継続する回収しながらの灌流ベースのプロセスを使用してバイオリアクター中で成長させる。なおさらにより好ましくは、トランスフェクトした細胞を、最大90日継続する回収しながらの灌流ベースのプロセスを使用してバイオリアクター中で成長させる。

#### 【0038】

好ましい実施形態によれば、トランスフェクトした細胞を、10 $\mu$ mのメンブレン、1 $\mu$ mのメンブレン、およびその後の0.2 $\mu$ mのメンブレンなどの連続的メンブレンによる濾過によってバイオリアクター上清から実質的に除去することができる。任意の残存回収培地を、濾過前に破棄することができる。

#### 【0039】

チャイニーズハムスター卵巣細胞中で組換えヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼを生産することができる(Peters, et al. J. Biol. Chem. 265:3374-3381)。その取り込みは、全てではないがほとんどの細胞で発現する高親和性マンノース-6-リン酸受容体によって媒介される(Neufeld et al., 「The mucopolysaccharidoses」 The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver, et al. New York: McGraw-Hill (1989) p. 1565-1587)。一旦マンノース-6-リン酸受容体に結合すると、酵素は被覆小窩によってエンドサイトーシスを受け、リソソームに輸送される。リソソームのpHで、酵素は活性であり、蓄積された硫酸デルマトンから硫酸残基を除去し始める。MPS VI線維芽細胞では、貯蔵物のクリアランスは急速であり、酵素暴露から92時間以内に容易に示される(Anson, et al., J. Clin. Invest. 99:651-662 (1997))。図1に概説する流れ図によるプロセスにしたがって、110L(作業体積約90L)の発酵規模で組換え酵素を生産することができる。

#### 【0040】

表1A~Cに記載の以下の方法を使用して組換え酵素を生産することができる。

#### 【0041】

【表 1】

表 1A: フェッドバッチプロセスによる細胞培養プロセス

工程	プロセス	プロセス中の試験
1. ワーキングセルバンク(WCB)の解凍	<ul style="list-style-type: none"> <li>・4mM L-グルタミン、4.5g/Lグルコース、および 10mg/L ヒポキサンチン/チミジンを補足し、葉酸、セリン、およびアスパラギン (G418 なし) をさらに補足した 25mL の JRH Exell 302 培地を含む 1 つの T-75 フラスコに解凍細胞を摂取する</li> <li>・<math>1 \times 10^{10}</math> 個の細胞密度を達成するために 3 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
3. 250mL スピナーフラスコ	<ul style="list-style-type: none"> <li>・175mL の補足培地 (G418 なし) に細胞を添加する</li> <li>・3 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
4. 1L スピナーフラスコ	<ul style="list-style-type: none"> <li>・800mL の補足培地 (G418 なし) に細胞を添加する</li> <li>・1~2 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
5. 8L スピナーフラスコ	<ul style="list-style-type: none"> <li>・4L の補足培地 (G418 なし) に細胞を添加する</li> <li>・1~2 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
6. 2×8L スピナーフラスコ	<ul style="list-style-type: none"> <li>・作業体積を 2×8L スピナーフラスコに分ける</li> <li>・各 8L スピナーフラスコに対して 5.5L の補足培地に細胞を添加する</li> <li>・1~2 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
7. 110L バイオリクターへの接種	<ul style="list-style-type: none"> <li>・7mL の補足培地に細胞を添加する</li> <li>・9 日間培養する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> </ul>
	↓	
8. 産生	<ul style="list-style-type: none"> <li>・バイオリクター中で約 9 日間成長させる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞数</li> <li>・細胞生存率</li> <li>・活性</li> </ul>
	↓	
9. 上清の回収	<ul style="list-style-type: none"> <li>・100L バッグに回収物を注ぎ、一晩冷却する</li> </ul>	
	↓	
10. 細胞の除去	<ul style="list-style-type: none"> <li>・10<math>\mu</math>m メンブレンによる円心分離およびその後の 1<math>\mu</math>m および 0.2<math>\mu</math>m カートリッジによる濾過によって回収培地から細胞を除去する。細胞を一晩静置し、最終的に濾過前に 5~10%の回収培地を破棄する。</li> </ul>	QC 放出点 (Release Point) <ul style="list-style-type: none"> <li>・活性</li> <li>・生物汚染度</li> <li>・内毒素</li> <li>・マイコプラズマ</li> <li>・インビトロ偶発因子</li> </ul>

## 【 0 0 4 2 】

1 つの実施形態では、トランスフェクトした細胞を、1 つの 110 L バイオリクターから 1 日あたり約 400 L の回収速度で最大 35 日間またはそれ以上連続して回収しながらの灌流ベースのプロセスである細胞培養プロセスで成長させる。好ましくは、回収速度は、1 つの 110 L バイオリクターから 1 日あたり約 800 L である。灌流細胞培養プロセスとバッチ細胞培養プロセスとを比較したプロセスの流れ図を表 1 B に示す。フェッドバッチプロセスとの比較および灌流ベースの細胞培養プロセスのために実施した特定の変更の詳細を表 1 C に示す。

10

20

30

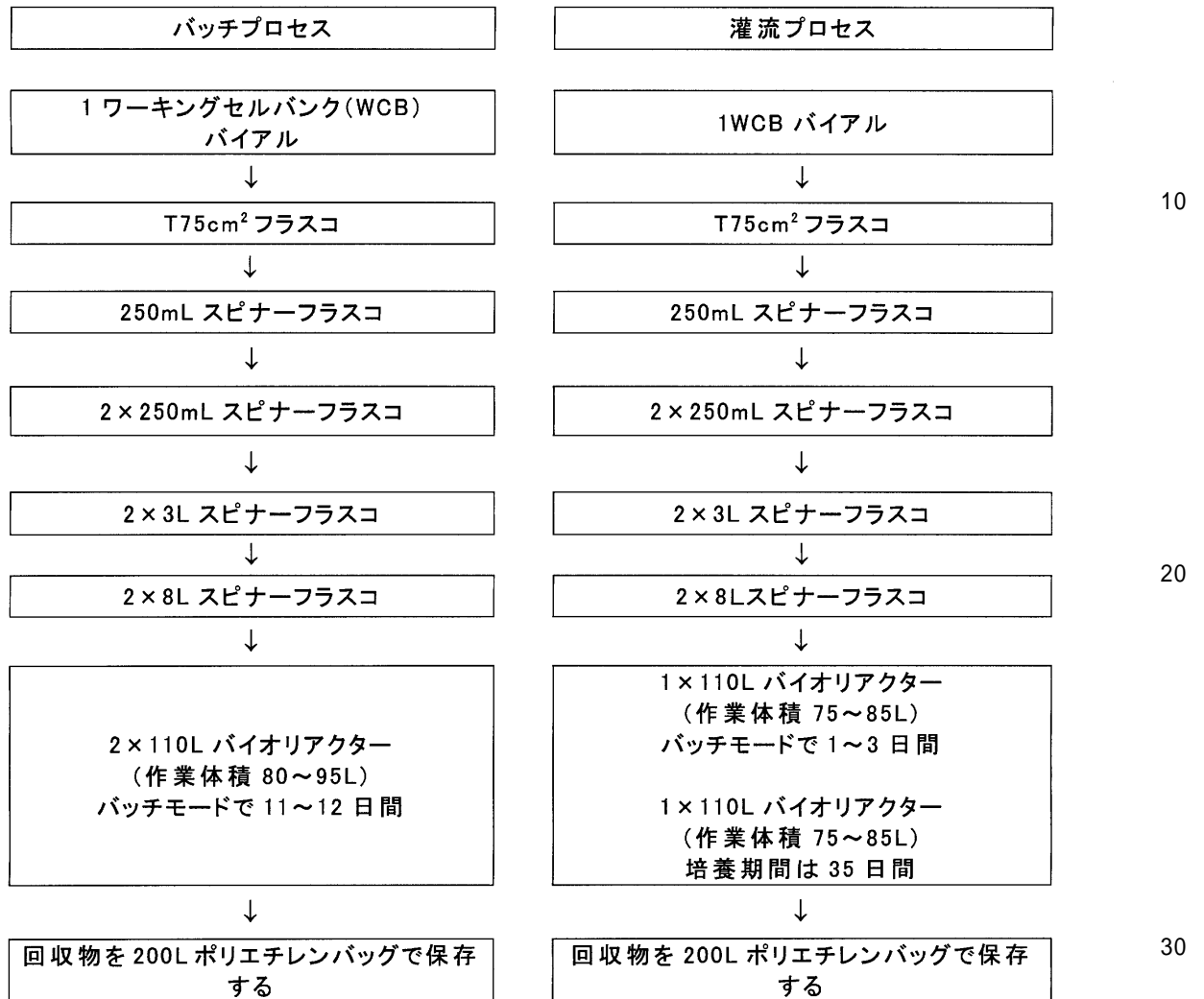
40

50

【 0 0 4 3 】

【 表 2 】

表 1B: フェッドバッチプロセスと灌流プロセスとの細胞培養プロセスの比較



【 0 0 4 4 】

【表 3 A】

表 1C: フェッドバッチプロセスと灌流プロセスとの間の相違の説明のまとめ

精製工程	説明 (バッチ)	説明 (灌流)
細胞培養	1つのバッチは2つの110L バイオリアクターで運転した1つの生産物の結果である	変更: 1つのバッチは1つの110L バイオリアクターで運転した1つの生産物の結果である
WCB バイアルの解凍	各産生バッチにつき1バイアル 試験: 推定細胞生存率>95% $1 \times 10^6$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更: 細胞生存率:>90% 明細事項を満たす首尾の良い運転および産生を実施するための解凍時の生存率は90%超であることが判明した
↓		
T75cm <sup>2</sup> フラスコ	1つのフラスコに約 $5 \times 10^6$ 個の細胞をプレートした 工程の長さ: 約3日間 試験: 推定細胞生存率>90% $2 \times 10^7$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更なし
↓		
250mL スピナー フラスコ	T75 由来の細胞を、250mL スピナーフラスコに分ける。 工程の長さ: 約2日間 試験: 推定細胞生存率>90% $2 \times 10^8$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更なし
↓		
2×250mL スピナー フラスコ	1×250mL スピナーフラスコ由来の細胞を、2つの250mL スピナーフラスコに分ける。 工程の長さ: 約3日間 試験: 推定細胞生存率>90% $4 \times 10^8$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更なし
↓		
2×3L スピナー フラスコ	2×250mL スピナーフラスコ由来の細胞を、2つの3L スピナーフラスコに分ける 工程の長さ: 4日間 試験: 推定細胞生存率>90% $4.8 \times 10^9$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更なし
↓		

10

20

30

40



【表 3 B】

精製工程	説明 (バッチ)	説明 (灌流)
2×8L スピナー フラスコ	2×3L スピナーフラスコ由来の細胞を、2つの8Lスピナーフラスコに分ける。 工程の長さ: 約2日間 試験: 推定細胞生存率>90% $1.6 \times 10^{10}$ 個以上の細胞と推定される場合に回収する	変更なし
↓		
培養フラスコの 接種	$0.8 \times 10^{10}$ 個以上の細胞接種物を、それぞれ32Lの培養培地を含む2つの各バイオリアクターに添加する。 培養を、PC 接続制御システムでモニタリングする。	変更: $1.6 \times 10^{10}$ 個以上の細胞接種物を、64Lの培養培地を含む1つのバイオリアクターに添加する(2つに対して1つのバイオリアクターの使用を反映する)。
↓		
産生	成長: 培養物が $3.2 \times 10^{10}$ 個を超える細胞密度に達するまで3日間 縦割り (Vertical Split): 培養培地を95Lの最終体積まで添加する。 回収: 11日目または細胞生存率が70%に低下した場合に上清を回収した。 上清を濾過し、保存する。	変更: 成長/移行/回収: 細胞密度が $8 \times 10^{10}$ 細胞/mL 超に到達した場合、灌流を開始する。灌流速度は、グルコースレベルに基づいて、5容器体積/日まで段階的に増加させる。細胞密度が $1.28 \times 10^{12}$ 超である場合、pHの設定値を7.35に調整する。一旦灌流速度の増大が停止すると、細胞の抜き取りによる細胞密度の減少によって、グルコースレベルを維持する。回収物の上清を回収し、濾過する。
終了	回収時に運転を終了する	変更: 35日またはそれ以上に到達後、3日連続で活性が2mg/L未満に低下した場合、または適切な回収上清が回収された場合に運転を終了する。

## 【0045】

スケールアッププロセスのための接種調製物は、フェッドバッチプロセスおよび灌流プロセスのそれと同一である。1つの実施形態では、ワーキングセルバンク由来の1つのバイアルの解凍およびその内容物(約1mL)の約25mLのEX-CELL 302培地(L-グルタミンで修正、フェノールレッドなし)を含むT75cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコへの移行によって、rhASB細胞培養を開始する。各拡大ステップでは、約 $0.8 \times 10^6$ 細胞/mLの生細胞数に達するまで細胞培養物を接種する。細胞成長(細胞密度)および生存率(トリパンブルー排除経路)について各細胞拡大ステップをモニタリングする。全EX-CELL 302培地(L-グルタミンで修正、フェノールレッドなし)の添加および細胞導入を層流フード中で個別に行う。細胞培養物を、T75cm<sup>2</sup>フラスコから250mLスピナー

フラスコ、2つの250mLスピナーフラスコ、2つの3Lスピナーフラスコ、最後に2つの8Lスピナーフラスコに連続的に拡大する。全スケールアッププロセスを約14日間継続する。2つの8Lスピナーフラスコの密度が少なくとも $1.0 \times 10^6$ 細胞/mLである場合、フラスコを使用して1つの110Lバイオリアクターに播種する。

【0046】

rhASBの発現または生産もしくは製造のためのバイオリアクターの操作は、灌流ベースの細胞培養プロセスを使用することが好ましい。好ましくは、灌流プロセスを使用するバイオリアクターは、フェッドバッチプロセスを使用した400~500万細胞/mLと比較して3700万細胞/mLもの細胞密度に制御することができる。

【0047】

フェッドバッチプロセス(11~12日間)よりも長期間(35日間)灌流ベースのプロセスを行い、フェッドバッチプロセス(190L/運転)と比較してより大量の回収細胞培養流動物(1日あたり5容器体積の灌流速度で約400L/日)が生産される。好ましくは、約8400Lの総上清回収のために35日まで回収を行う。

【0048】

ICHガイドラインに従って、遺伝的安定性、同一性、滅菌、および偶発的因子汚染について、産生終了細胞(EPC:End of Production Cell)を評価する。好ましくは、cGMP条件下で産生された35日間の長期バイオリアクター運転から得られたEPCの結果物(AC60108)は、成長しないか負の結果が得られるか、細菌、真菌、マイコプラズマ、偶発的ウイルス夾雑物、マウスウイルス、または類似の夾雑物もしくは粒子は検出されない。

【0049】

第4の態様では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを産生する能力を特徴とするトランスフェクトした細胞を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)を安定且つ確実に産生するCHO-K1細胞系統などの組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞系統を特徴とする。CSL4S-342と呼ばれるCHO-K1細胞系統が特に好ましい。いくつかの好ましい実施形態では、細胞系統は、1つまたは複数の発現構築物を含む。より好ましくは、細胞系統は、約10またはそれ以上の発現構築物のコピーを含む。さらにより好ましい実施形態では、細胞系統は、少なくとも約20~80または40~80 $\mu$ g/ $10^7$ 細胞/日の量で組換えN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)を発現する。

【0050】

組換えヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(rhASB)を、CSL4S-342と命名された安定にトランスフェクトされたCHO-K1(チャイニーズハムスター卵巣)細胞系統から生産することができる。細胞系統は、文献(Crawley, J. Clin. Invest. 99:651-662(1997))に記載されている。マスターセルバンク(MCB)およびワーキングセルバンク(WBC)を、Tektogen Inc.(Malvern, PA)で調製した。セルバンクを、組換え哺乳動物細胞系統についてのICH推奨ガイドラインによって特徴づけた。

【0051】

第5の態様では、本発明は、酵素治療で 사용할 ことができる量のN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの生産に適切な新規のベクターを提供する。

【0052】

第6の態様では、本発明は、本発明の方法にしたがって生産され、それにより酵素治療で 사용할 ことができる量で存在する、新規のN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログを提供する。本発明のN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(ASB)の好ましい比活性は、約20~90単位/mgタンパク質、より好ましくは約50単位/mgタン

10

20

30

40

50

パク質を越える範囲である。好ましくは、脱グリコシル化酵素の分子量は、約 55 ~ 56 kDa、最も好ましくは約 55.7 kDa である。好ましくは、グリコシル化酵素の分子量は、約 63 ~ 68 kDa、最も好ましくは約 64 ~ 66 kDa である。本発明には、生物活性フラグメント（天然に存在するヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの短縮分子、アナログ、および変異体が含まれる）も含まれる。

#### 【0053】

N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼのヒト cDNA から 41 アミノ酸のシグナルペプチドを含む 533 アミノ酸のタンパク質が予想される (Peters, et al. J. Biol. Chem. 265:3374-3381)。シグナルペプチド切断後の推定分子量は約 55.9 kDa である。SDS - PAGE による炭水化物修飾に起因する組換え酵素の見かけ上の分子量は 64 kDa である。推定タンパク質配列は、6つの潜在的な N 結合オリゴサッカリド修飾部位を含み、2,000 kDa の平均分子量および推定分子量と見かけ上の分子量との間の 8,000 kDa の分子量の相違に基づく、そのうちの 4 つが、使用されていると考えられる。成熟形態の細胞内タンパク質は、システイン結合によって結合した 3 つのペプチドを有する。最も巨大なペプチドの分子量は 47 kDa であり、他の 2 つの平均分子量はそれぞれ 6 kDa および 7 kDa である。

#### 【0054】

本発明の方法にしたがって製造および精製された製剤の説明を表 2 に示す。

#### 【0055】

#### 【表 4】

表 2: 製剤の予備的仕様

試験	手順	仕様
活性	蛍光アッセイ	20,000~120,000m 単位
偶発的ウイルス*	インビトロアッセイ	合格
外観	目視	透明、無色～淡黄色の溶液
細菌内毒素	LAL	2EU/mL 以下
塩化物	原子吸光	報告値 (Report Value)
ASB 線維芽細胞取り込みアッセイ	TBD	40nmol 以下
マイコプラズマ*	1993 年の留意事項	合格
微粒子	USP	25μm で 600/ウイルス以下 および 10μm で 6000/ウイルス以下
PH	USP	5.5~6.8
リン酸塩	原子吸光	報告値
タンパク質濃度	UV280	0.8~1.2mg/ml
純度	SDS PAGE	65~70 kDa の 1 つの主なバンド
	RP-HPLC	95%超
残存青色色素	TBD	報告値
残存銅	TBD	報告値
ナトリウム	原子吸光	報告値
比活性	計算	40,000~80,000m 単位/mg
滅菌	21CFR 610	合格

\* バイオリアクター由来の回収した上清において試験した（濾過による細胞取り出し後）。

#### 【0056】

第 7 の態様では、本発明は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ (ASB)、またはその生物活性フラグメント、変異体、もしくはアナログの新規の精製方法を

特徴とする。第1の実施形態によれば、トランスフェクトした細胞塊を成長させ、これを除去し、組換え酵素を放出させる。カラム汚染を防止するために、外因性物質を、通常、粗バルクから分離すべきである。好ましくは、組換え酵素を含む成長培地に対して限外濾過およびダイアフィルトレーションを行う。1つの方法では、濾過溶液を、DEAE Sepharoseクロマトグラフィカラム、その後Blue Sepharoseクロマトグラフィカラム、その後Cu++ Chelating Sepharoseクロマトグラフィカラム、その後Phenyl Sepharoseクロマトグラフィカラムに通過させる。DEAE Sepharose、Blue Sepharose、Cu++Chelating Sepharose、およびPhenyl Sepharoseクロマトグラフィカラムの連続的使用を含むこのような4ステップカラムクロマトグラフィにより、特に高度に精製された組換え酵素が得られる。当業者は、1つまたは複数のクロマトグラフィステップを省略または置換することができるか、クロマトグラフィステップの順序を本発明の範囲内で変化させることができることを認識する。他の好ましい実施形態では、最後のクロマトグラフィカラム由来の溶離物に対して限外濾過/ダイアフィルトレーションを行い、任意の残存ウイルスを除去するための適切なステップを行う。最後に、所望ならば、適切な滅菌ステップを行うことができる。図2に概説したプロセスにしたがって組換え酵素を精製することができる。組換え酵素の性質は、患者への鍵となる。本方法によって生産されたr h A S Bは実質的に純粋である(95%超)。

#### 【0057】

好ましい実施形態では、約10mMのリン酸ナトリウム溶液および約100mMの塩化ナトリウム溶液(約pH7.3)を使用して限外濾過/ダイアフィルトレーションステップを行う。別の実施形態では、溶離液を適切な緩衝液、好ましくは塩化ナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液を使用して調整する、約pH7.3でのDEAE Sepharoseクロマトグラフィステップを行う。さらに好ましい実施形態では、溶離液を適切な緩衝液、好ましくは塩化ナトリウム-酢酸ナトリウム緩衝液を使用して調整する、約pH5.5でのBlue Sepharoseクロマトグラフィステップを行う。また、好ましい実施形態では、溶離緩衝液(塩化ナトリウム-酢酸ナトリウム緩衝液が含まれる)を使用してCu++Chelating Sepharoseクロマトグラフィステップを行う。特に好ましい実施形態では、組換え酵素を約pH5.5~6.0、最も好ましくはpH5.8の塩化ナトリウム-リン酸ナトリウムなどの組成から成る緩衝液中に約1mg/mlの濃度に濃縮する、クロマトグラフィ由来の溶離液に対して第2の限外濾過/ダイアフィルトレーションステップを行う。リン酸緩衝液は酵素の重大な分解を防止し、且つ安定性を改善するので、リン酸緩衝液がプロセスで使用する好ましい緩衝液である。

#### 【0058】

本発明の範囲内の特に好ましい精製方法のより詳細な説明を表3に示す。

#### 【0059】

【表 5 A】

表 3: 精製プロセスの概要

工 程	プロセス	
1. UF/DF	濾過した回収流動物 (HF) を 10 倍に濃縮し、5 倍体積の 10mM リン酸ナトリウム、100mM NaCl (pH7.3) を使用したクロスフロー濾過 (TFF) システムを使用して、ダイアフィルトレーションを行う。	
	↓	
2. DEAE Sephacrose FF (灌流)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・予洗液 1 緩衝液: 0.1N NaOH</li> <li>・予洗液 2 緩衝液: 100mM NaPO<sub>4</sub> (pH7.3)</li> <li>・平衡化緩衝液: 100mM NaCl、10mM NaPO<sub>4</sub> (pH7.3)</li> <li>・ロード: 工程 1 由来の産生物</li> <li>・洗浄緩衝液: 100mM NaCl、10mM NaPO<sub>4</sub> (pH7.3)</li> <li>・ストリップ緩衝液: 1M NaCl、10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH7.3)</li> <li>・浄化緩衝液: 0.5N NaOH</li> <li>・保存緩衝液: 0.1N NaOH</li> </ul>	10
	↓	
3. Blue Sephacrose FF	<ul style="list-style-type: none"> <li>・予洗液 1: 0.1N NaOH</li> <li>・予洗液 2: H<sub>2</sub>O</li> <li>・予洗液 3: 1M NaAc (pH5.5)</li> <li>・平衡化緩衝液: 150mM NaCl、20mM NaAc (pH5.5)</li> <li>・ロード: DEAE の灌流物</li> <li>・洗浄緩衝液: 150mM NaCl、20mM NaAc (pH5.5)</li> <li>・溶離緩衝液: 500mM NaCl、20mM NaAc (pH5.5)</li> <li>・再生緩衝液: 1M NaCl、20mM NaAc (pH5.5)</li> <li>・浄化緩衝液: 0.1N NaOH、0.5~2 時間</li> <li>・保存緩衝液: 500mM NaCl、20mM NaAc (pH5.5)、20% ETOH</li> </ul>	20
	↓	
4. Cu <sup>++</sup> Chelating Sephacrose FF	<ul style="list-style-type: none"> <li>・浄化緩衝液: 0.1 N NaOH</li> <li>・洗浄緩衝液: H<sub>2</sub>O</li> <li>・チャージ緩衝液: 0.1M 硫酸銅</li> <li>・平衡化緩衝液: 20mM NaAc、0.5 M NaCl、10%グリセロール (pH6.0)</li> <li>・ロード: Blue Sepharose の溶離物</li> <li>・洗浄緩衝液 1: 20mM NaAc、0.5M NaCl、10%グリセロール (pH6.0)</li> <li>・洗浄緩衝液 2: 20mM NaAc、1M NaCl、10%グリセロール (pH4.0)</li> <li>・洗浄緩衝液 3: 20mM NaAc、1M NaCl、10%グリセロール (pH3.8)</li> <li>・溶離緩衝液: 20mM NaAc、1M NaCl、10%グリセロール (pH3.6)</li> <li>・ストリップ緩衝液: 50mM EDTA、1M NaCl</li> <li>・浄化緩衝液: 0.5N NaOH、0.5~2 時間</li> <li>・保存緩衝液: 0.1N NaOH</li> </ul>	30
	↓	40

【表 5 B】

工 程	プロセス
5. Phenyl Sepharose HP	<ul style="list-style-type: none"> <li>・予洗液 1 緩衝液: 0.1N NaOH</li> <li>・予洗液 2 緩衝液: H<sub>2</sub>O</li> <li>・平衡化緩衝液: 3M NaCl, 20mM NaAc (pH4.5)</li> <li>・ロード: Cu<sup>++</sup> Chelating Sepharose の溶離物</li> <li>・洗浄緩衝液 1: 3.0M NaCl, 20mM NaAc (pH4.5)</li> <li>・洗浄緩衝液 2: 1.5M NaCl, 20mM NaAc (pH4.5)</li> <li>・溶離緩衝液 1: 1.0M NaCl, 20mM, NaAc (pH4.5)</li> <li>・ストリップ緩衝液: 0M NaCl, 20mM NaAc (pH4.5)</li> <li>・浄化緩衝液: 0.5N NaOH</li> <li>・保存緩衝液: 0.1N NaOH</li> </ul>
	↓
6. UF/DF	精製 rhASB を濃縮し、TFF システムを使用して組成から成る緩衝液 (150mM NaCl, 10mM NaPO <sub>4</sub> (pH5.8) 中に 1.5mg/ml の最終濃度までダイアフィルトレーションを行う。
	↓
7. 処方 (必要な場合)	・さらなる組成から成る緩衝液を使用して 1.0mg/ml まで希釈する。
	↓
8. ウイルスの減少／濾過滅菌	・0.02μm メンブレンにより滅菌コンテナに濾過する。
	↓
9. バイアル封入 (Vialing)	・産生物を 5cc の Type 1 ガラスバイアルに充填し、手作業で栓をし、圧着し、ラベルを付ける。

10

20

## 【 0 0 6 0 】

処方したバルク製剤物質を、クラス 1 0 0 層流フード中の 0 . 0 4 ミクロン、好ましくは 2 μm のフィルターにて T y p e 1 ガラスバイアルに濾過滅菌することができる。半自動式液体充填装置を使用して、バイアルに約 5 m L の最終濃度まで充填することができる。次いで、バイアルを手作業で栓をし、密封し、ラベルを付けることができる。

## 【 0 0 6 1 】

30

前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼのより好ましい精製方法は、( a ) 前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む流動物を得るステップと、( b ) 前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを切断することができる前記流動物中のプロテアーゼのタンパク質分解活性を減少させるステップであって、前記減少が前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼに悪影響を与えない、ステップと、( c ) 前記流動物を Cibracon blue dye 相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( d ) 前記流動物を銅キレート化クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( e ) 前記流動物をフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィ樹脂と接触させるステップと、( f ) 前記前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを回収するステップとを含む。好ましくは、ステップ ( c )、( d )、および ( e ) を連続的に行う。この方法は、3 つのクロマトグラフィのステップまたはカラムしか必要ない。高度に精製された前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを得るために、さらなるクロマトグラフィのステップおよびカラムは必要ない。この方法は、DEAE Sepharose 樹脂を含む流動物を含まない。回収された前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの純度は、少なくとも 9 9 % またはそれ以上である。総回収率は、少なくとも 4 0 ~ 6 0 % であり得る。

40

## 【 0 0 6 2 】

好ましくは、前駆体 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを含む流動物を得るステップは、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをコードする遺伝子、好ましくはヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼをコードする遺伝子

50

で形質転換された細胞培養物を成長させるステップを含む。好ましくは、細胞は哺乳動物細胞である。より好ましくは、哺乳動物細胞はチャイニーズハムスター卵巣細胞である。得るステップは、細胞培養物から流動物を回収するステップをさらに含み得る。得るステップは、流動物を約20倍に濃縮するステップをさらに含み得る。

#### 【0063】

この方法の特徴は、プロテアーゼ活性と前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼとの初期の分離である。この分離は、(1)プロテアーゼ活性の減少、阻害、もしくは相互作用、または(2)前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼからのプロテアーゼの物理的分離のいずれかを含み得る。好ましくは、この分離は、精製プロセスの間にできるだけ早く行う。目的は、成熟もしくはプロセシング形態および/または他の分解形態に分割される前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの分子数を最小に維持することである。標的組織により容易に取り込まれてその後リボソームにターゲティングされるので、成熟またはプロセシング形態と対照的にN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの前駆体形態は好ましい形態である。前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼからプロテアーゼ活性をより早く分離する。前駆体形態の分子数が少ないほど成熟形態またはプロセシング形態に分割される。

#### 【0064】

流動物のpH値の約4.8 ~ 8.0への調整によってプロテアーゼ活性を減少または阻害する。好ましくは、pH値は、約4.8 ~ 5.5である。より好ましくは、pH値は、約4.8と5.2との間である。減少が望ましいプロテアーゼの比活性は、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼの前駆体形態を成熟形態またはプロセシング形態に特異的に切断するプロテアーゼ活性である。プロテアーゼ活性は、1つまたは複数のシステインプロテアーゼで見いだされる。前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを特異的に切断するシステインプロテアーゼはカテプシンLである。不活性形態のカテプシンLの分子量は約36 kDaであり、5.0未満のpHへの暴露の際にサイズが21 ~ 29 kDaの活性形態に変換される(図9Cを参照のこと)。pHを、プロテアーゼはその不活性形態から活性形態に変換されず、且つ所望の前駆体N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼまたはその生物活性は悪影響を受けないか不可逆的に悪影響を受けない任意の値に調整することができる。

#### 【0065】

好ましくは、ステップ(c)は、流動物をCibacron blue dye相互作用クロマトグラフィカラムに通過させることを含む。より好ましくは、Cibacron blue dye相互作用クロマトグラフィカラムは、Blue Sepharose 6 Fast Flowカラムである。好ましくは、ステップ(d)は、流動物を銅キレート化クロマトグラフィカラムに通過させることを含む。より好ましくは、銅キレート化クロマトグラフィカラムは、Chelating Sepharose Fast Flowカラムである。好ましくは、ステップ(e)は、前記流動物をフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィカラムに通過させることを含む。より好ましくは、フェニル疎水性相互作用クロマトグラフィカラムは、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Subカラムである。好ましくは、ステップ(c)、(d)、および(e)の時間的な順序は、ステップ(c)、ステップ(d)、およびステップ(e)である。

#### 【0066】

回収ステップは、流動物の限外濾過/ダイアフィルトレーションを含み得る。回収ステップは、DNA除去のための流動物の濾過および/またはウイルス除去のための流動物の濾過を含み得る。ウイルス除去のための濾過は、流動物の0.02 μmフィルターへの通過を含み得る。

#### 【0067】

この方法を使用して、N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼまたはその生物活性フラグメント、アナログ、もしくは変異体を精製することもできる。

#### 【0068】

r h A S Bの純度を、疎水性の相違に基づいてタンパク質を分離する逆相高速液体クロ

10

20

30

40

50

マトグラフィ ( R P - H P L C : reverse-phase high performance liquid chromatography ) を使用して測定または決定する。このアッセイは、固定相として C 4 カラム ( Phenomenex Jupiter ) を、移動相として水 : アセトニトリルを使用する。タンパク質サンプルを最初に水を含むカラムに注入し、これらの条件下で、全てのタンパク質がカラムに結合する。次いで、漸増濃度のアセトニトリルを、カラムに注入する。このアセトニトリル勾配により、各タンパク質が移動相中で溶解するようになり、カラムから溶離する点まで移動相の疎水性が増加する。これらの溶離時間は、混合物中の各タンパク質で正確に再現可能である。210nmでの紫外線吸収によってクロマトグラフィ上のピークとしてタンパク質を検出する。各ピーク領域を計算し、サンプルの純度をクロマトグラム中の r h A S B ピークと総ピーク領域との比として計算することができる。R P - H P L C は、高分解能で再現可能な実績のある r h A S B の純度の決定方法である。

10

#### 【 0 0 6 9 】

本願以前の研究で、夾雑タンパク質 E L I S A の実施によって A S B の純度が決定されることが示されている。この夾雑タンパク質 E L I S A の使用方法 ( その詳細は開示されていない ) は、おそらくタンパク質宿主 - 細胞夾雑タンパク質の混合物に対して惹起された抗体を使用している。抗体を作製するために使用した潜在的夾雑タンパク質の同一の混合物の検量線を使用して、E L I S A を行った可能性が高い。試験サンプルを、夾雑レベルについて標準的な混合物と比較して定量した可能性が高い。これらのアッセイはタンパク質精製で有益なツールであるが、以下の理由で生産物の純度の決定について R P - H P L C よりも精度が低い。

20

#### 【 0 0 7 0 】

( 1 ) R P - H P L C では、r h A S B と夾雑物との比率を、同一の測定 ( U V 吸収 ) で両方決定する。E L I S A では、抗体結合によって夾雑濃度を決定するのに対して、標的タンパク質の含有量を別のアッセイ方法 ( 通常、U V 吸収または Bradford 法 ) で決定する。「純度」値を、同一の方法によって実験的に決定された同一の単位を使用した 2 つの量の比として計算すべきである。

#### 【 0 0 7 1 】

( 2 ) E L I S A を十分に機能させるために、抗体によって検出されたサンプルは標準と同一のタンパク質組成を有さなければならない。これは、夾雑タンパク質 E L I S A の場合、可能性は極めて低い。このアッセイ型のアッセイ標準は、抗体が産生された多数の各タンパク質の混合物である。しかし、夾雑物タンパク質は、精製 r h A S B 生産物中に小集団でしか存在しないはずである。したがって、抗体試薬は、ここでは異なるタンパク質混合物を検出し、反応対標準はおそらくほとんど非直線形である。これが起こる場合、アッセイにより、各サンプル希釈について正味の値が異なるので、希釈物 ( 存在する場合 ) は正確な値が得られるかわからない。

30

#### 【 0 0 7 2 】

( 3 ) さらに、全ての潜在的夾雑物タンパク質が、免疫原性を示すか、抗体作製に使用されるウサギなどの動物と同程度の免疫原性を示すわけではない。したがって、E L I S A によって決定された夾雑物レベルは、精製生産物中に存在する夾雑物の小集団にのみを反映し得る。全く検出できない生産物中の 1 つまたは複数の夾雑物を有することは十分可能である。対照的に、R P - H P L C は、U V 吸収はタンパク質分子の普遍的性質であるので、全てのタンパク質を検出する。

40

#### 【 0 0 7 3 】

( 4 ) 最後に、精製製剤中に以下の 2 つの夾雑物型が存在する。生産物非関連夾雑物 ( 上記考察の宿主細胞タンパク質 ) および生産物関連夾雑物 ( プロセシング形態および凝集物を含む分解生産物 ) 。夾雑物 E L I S A によって後者を検出することができないが、R P - H P L C によって容易に検出することができる。

#### 【 0 0 7 4 】

したがって、夾雑タンパク質 E L I S A から得た実際の数には疑いの余地があり、R P - H P L C はより確かな基礎に基づく。

50



## 【 0 0 7 5 】

さらに、S D S - P A G E 分析により、宿主細胞夾雑物と所望の薬物タンパク質生産物のプロセシング形態または分解形態との両方を検出可能である。ウェスタンブロットと組み合わせて使用した場合、宿主細胞汚染物由来の生産物非関連夾雑物を、生産物関連夾雑物と区別することができる。最後に、異なる分子量の夾雑物（低分子量のタンパク質のプロセシング形態または分解形態ならびに単量体、二量体、および他の多量体が含まれる）を検出することができるので、S E C - H P L C により、生産物関連夾雑物レベルを定量可能である。

## 【 0 0 7 6 】

この精製方法の実施形態を表 4 に示す。

10

## 【 0 0 7 7 】

## 【表 6 A】

表 4: 精製方法

工 程	プロセス
回収濾過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 清澄化フィルター、0.45<math>\mu</math>m フィルター、および最後の・・・<math>\mu</math>m フィルターによる濾過</li> <li>・ 濾過したプール回収物をポリプロピレンバッグ中で保存する</li> </ul>
UF 濃縮	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化およびフラッシュ: 100 mM リン酸ナトリウム (pH7.3)</li> <li>・ ロード: 濾過回収流動物</li> <li>・ 濃縮: 20 倍濃縮</li> <li>・ 濾過: 希釈産生物を 0.2<math>\mu</math>m フィルターで保存コンテナに濾過する</li> </ul>
pH 調整および濾過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ pH の調整: 約 7.3 またはそれ以下（好ましくは、pH は約 4.0～7.3 であり、より好ましくは、pH は約 4.5～5.5 であり、さらにより好ましくは、pH は約 5.0 である）の最終 pH までプールした 20 倍濃縮物に 10% 氷酢酸を添加する。</li> <li>・ ロード: プールした 20 倍濃縮物</li> <li>・ リンス: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 清澄化フィルターおよび 0.2<math>\mu</math>m フィルターでの濾過</li> <li>・ フラッシュ: 20mM 酢酸ナトリウム、120mM 塩化ナトリウム (pH5.0)</li> <li>・ 回収率は少なくとも約 83% であり得る</li> </ul>
Gibracon blue dye 相互作用クロマト グラフィカラム (Blue Sepharose 6 FF)  (Blue, Blue Sepharose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム (pH は約 6.5 未満であり、好ましくは pH は約 5.0～6.5 であり、より好ましくは、pH は約 6.45 である)</li> <li>・ ロード: pH を調整し、プールした 20 倍濃縮物を濾過した</li> <li>・ 洗浄: 10mM リン酸ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 溶離: 10mM リン酸ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 再生: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 浄化: 0.1 N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄 1: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 洗浄 2: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 保存: 20% エタノール</li> <li>・ 回収率は、少なくとも約 84% であり得る</li> </ul>

20

30

40

【表 6 B】

工 程	プロセス
銅キレート化 クロマト グラフィカラム (Chelating Sepharose FF)  (Copper, CG, Copper-Chelating)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水(WFI)</li> <li>・ チャージ緩衝液: 0.1M 硫酸銅</li> <li>・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH は約 6.0 未満であり、好ましくは pH は約 3.6~5.5 であり、より好ましくは、pH は約 5.5 である)</li> <li>・ ロード: 100mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム、50% グリセロール (pH5.2) の添加によってプールした Blue 溶離物のグリセロール含有率を 10% に調整する</li> <li>・ 洗浄 1: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH5.5)</li> <li>・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.9)</li> <li>・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.6)</li> <li>・ 溶離物を 30~120 分間保持し、その後 0.5M NaOH で pH4.5 に調整する</li> <li>・ 再生: 50mM EDTA、1.0M 塩化ナトリウム (pH8.0)</li> <li>・ 浄化: 0.5M 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 保存: 0.1M 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 回収率は少なくとも約 86% であり得る</li> </ul>
フェニル疎水性相互作用クロマトグラフィカラム (Phenyl Sepharose 6 FF High Sub)  (Phenyl, Phenyl High Sub)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1 N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水(WFI)</li> <li>・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、2.0 M 塩化ナトリウム (pH は約 4.5~7.1 であり、好ましくは、pH は約 4.5 である)</li> <li>・ ロード: 20mM 酢酸ナトリウム、5M 塩化ナトリウム (pH4.5) の添加によって Copper 溶離物の塩化ナトリウム含有量を 2M に調整する</li> <li>・ 洗浄 1: 10mM リン酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH7.1)</li> <li>・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、250mM 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 再生: 20mM 酢酸ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 浄化: 0.5N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 保存: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 回収率は少なくとも約 88% であり得る</li> </ul>
UF/DF、DNA 濾過、 ウイルス濾過、 処方	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> <li>・ 濃縮: NMT を 1.5mg/mL に濃縮する</li> <li>・ ダイアフィルトレーション: 10mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> <li>・ DNA 濾過: 産生物を DNA フィルターで濾過する</li> <li>・ ウイルスの濾過/希釈: 産生物を 0.02<math>\mu</math>m フィルターで濾過し、1.0mg/ml まで希釈する</li> <li>・ 処方: 50<math>\mu</math>g/mL の濃度のポリソルベート 80 を添加する</li> <li>・ 濾過: 希釈産生物を 0.2<math>\mu</math>m フィルターで保存コンテナに濾過する</li> </ul>

10

20

30

40

【0078】

このようにして得られた製剤の構成要素を表 5 に示す。本発明の範囲内の製剤組成物の構成要素を表 6 に示す。

【0079】

## 【表 7】

表5: 製剤の構成要素

構成要素	説 明
有効成分	組換えヒト N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ
賦形剤	リン酸ナトリウム(一塩基酸)1水和物 リン酸ナトリウム(二塩基酸)7水和物 塩化ナトリウム
コンテナ	Kimble Glass、I 型 5 ml 透明ガラスバイアル(Borosilicate West pharmaceuticals)、S-127 4432150 グレイストッパー

10

## 【0080】

## 【表 8】

表6: 製剤組成物

構成要素	量
RhASB	1 mg/mL
リン酸ナトリウム(一塩基酸)1水和物	9 mM
リン酸ナトリウム(二塩基酸)7水和物	1 mM
塩化ナトリウム	150 mM

20

## 【0081】

記載の本発明の以下の実施例は例示のみを目的として提供しており、本発明を決して制限しない。

## 〔実施例 1〕

## 【0082】

〔組換えヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼを使用した臨床評価〕

## 〔まとめ〕

マロトー - ラミー症候群としても公知の MPS VI の治療のために組換えヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ (rhASB) を示す。本発明者らは、代理および定義された臨床評価項目の安全性、薬物動態学、および初期応答について毎週の注入によって評価される初期の非盲検臨床試験からなる rhASB の臨床開発プログラムを提案する。5 人の評価可能な患者についての十分な安全性の情報を収集するために、最低 3 ヶ月間試験を行う。この時、1 mg / kg の初期用量で過剰な尿中グリコサミノグリカンは産生されないか、有意な直接的な臨床上の利点を得ることができるはずであり、安全性を確立し、且つさらなる有効性を評価するために、さらに 3 ヶ月間用量を倍増するか維持する。

30

## 【0083】

## 〔目的〕

本発明者らの主な目的は、最低 3 ヶ月間 MPS VI 患者における rhASB の毎週の注入の安全性を証明することである。安全性の測定には、副作用、免疫応答およびアレルギー反応 (補体活性化、組換え酵素に対する抗体形成)、完全な臨床化学パネル (腎機能および肝機能)、尿検査、および差分 CBC (CBC with differential) が含まれる。

40

## 【0084】

1 つの二次的目的は、MPS VI に影響を受けることが公知のいくつかのパラメータの変化のモニタリングによって有効性を評価することである。これらには、6 分間歩行試験 (運動耐容能の基準として)、全肺機能 (PFT) 評価、尿中グリコサミノグリカンレベルおよび肝腫脹レベル (腎臓および肝臓が GAG 貯蔵の基準として)、発育速度、関節の可動範囲、児童健康評価質問表 (Children's Health Assessment Questionnaire) (CHAQ)、視力、心機能、睡眠検査、および 2 つの異なる全体的評価 (一方は研究者、他

50

方は患者 / 介護者によって実施される ) が含まれる。第 2 の二次的目的は、循環における注入薬物の薬物動態パラメーター、ならびに組織源として白血球および口腔組織を使用した細胞内の酵素の全般的分布および半減期を決定することである。これらの測定は、細胞のリソソームに送達された酵素レベルに基づいた臨床反応と用量との関連を補助すると予想される。

#### 【 0 0 8 5 】

##### 〔 方法 〕

本発明者らは、M P S V I 患者の r h A S B を用いた治療の安全性を証明して臨床パラメーターを評価するために単一施設での非盲検試験を行う。2 週間のベースライン評価 ( 病歴および身体検査、心理検査、耐久力試験 ( トレッドミル ) 、標準的な臨床試験 ( C B C 、パネル 2 0 、 C H 5 0 、 U A ) 、身体 M R I もしくは C A T スキャン ( 肝臓および脾臓の適定、骨および骨髄の評価、ならびにリンパ節および扁桃のサイズ ) 、心臓学的評価 ( 心エコー図、E K G 、 C X R ) 、気道評価 ( 肺機能試験 ) 、睡眠中の閉塞性事象を研究するための睡眠検査、関節制限分析 ( 肘および指骨間関節の可動範囲を測定する ) 、 C N P 圧での P L 、および生化学研究 ( 2 つの原因における口腔 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ活性、2 つの原因における白血球 N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ活性、3 つの原因における尿中 G A G 、抗 r h A S B 抗体の E L I S A についての血清作製、および 2 4 時間の尿中クレアチニンクリアランス ) が含まれる ) のために患者を入院させる。上記評価に加えて、いくつかの身体の運動 ( 頭上への挙手および歩行など ) を行った各患者を撮影およびビデオ録画する。酵素注入前に抗ヒスタミンでの前治療を有効に使用することができるよう、患者への抗ヒスタミンを増量する。ヒト推奨用量 ( 1 m g / k g ) ( 5 0 単位 / k g ) を、4 時間にわたる静脈内注入によって毎週投与する。患者は、最初の 2 週間は病院に滞在し、その後の 4 週間は短期滞在する。最後の 6 週間の治療を、患者の自宅近くの施設で行う。3 ヶ月後に、完全な評価のために患者を病院に戻す。用量を 2 m g / k g に漸増する必要がある場合、患者を最初の 1 2 週間は上記と同一のスケジュールに従わせる。いずれかのシナリオにおいて、試験開始から 6 ヶ月間完全な評価も行う。試験を通して、安全性をモニタリングする。試験を終了した患者は、安全および有効性の条件が B L A 承認まで証明される限り、延長プロトコール後も治療を継続する。

#### 【 0 0 8 6 】

##### 〔 患者数および登録 〕

試験開始時に 1 人の患者を登録し、1 ヶ月後に 2 人のさらなる患者を登録し、治療に関連する任意の予期せぬ合併症を罹患しているさらなる 2 人の患者を 2 週間後に登録した。任意の登録患者が重症になるか、患児が生命を脅かすか有害な病態のために緊急の臨床手順が必要である場合、さらなる患者を許可すべきである。

#### 【 0 0 8 7 】

##### 〔 診断および対象 / 除外基準 〕

患者は、測定可能な臨床的徴候および M P S V I の徴候によって確認され、線維芽細胞の減少または白血球 A S B 酵素活性レベルによって支持された M P S V I の診断書を有する 5 歳またはそれ以上の男子または女子であり得る。出産能力を有する女性患者は、各投薬直前に妊娠検査 ( 尿中 - h C G ) が陰性でなければならず、且つ研究を通して医学的に許容された避妊法を使用することを忠告しなければならない。患者が以前に骨髄移植を受けている場合、妊娠もしくは授乳している場合、研究登録前 3 0 日以内に治療薬を受けている場合、または疾患、重篤な介入疾患、もしくは研究遵守を有意に減少し得る他の酌量すべき事情を有する場合、本研究から患者を除外する。

#### 【 0 0 8 8 】

##### 〔 用量、経路、および投与計画 〕

患者に 1 m g ( 約 5 0 単位 / k g ) の用量の r h A S B を本研究の最初の 3 ヶ月間投与する。過剰な尿中 G A G が妥当な量に減少せず、且つ臨床上的利点が認められない事象では、用量を倍増する。5 人の患者全員が 3 ヶ月間の治療を受けた後にのみ、用量を増大さ

せる。この r h A S B の投薬形態を、最低 1 2 週間連続して毎週 1 回約 4 時間にわたり静脈内投与する。末梢静脈カテーテルを、橈側皮静脈または他の適切な静脈に留置し、30 c c / 時間で生理食塩水の注入を開始する。試験前に完了した漸増試験に基づいて、患者に 1 . 2 5 m g / k g までのジフェニルヒドラミンを静脈内に前投薬する。r h A S B を、1 m g / m l ヒトアルブミンを補足した 1 0 0 c c の通常の生理食塩水で希釈する。心肺およびパルス酸素濃度計でモニタリングしながら、1 m g / k g ( 約 5 0 単位 / k g ) の希釈酵素を注入する。患者を臨床的および注入に対する任意の副作用についてモニタリングする。任意の異常な症状 ( 倦怠感、息切れ、低酸素症、低血圧、頻脈、吐気、悪寒、熱、および腹痛が含まれるが、これらに限定されない ) が認められる場合、直ちに注入を中止する。臨床症状および徴候に基づいて、さらなるジフェニルヒドラミンの投与、マスクによる酸素、静脈内への流動物のボラス、またはステロイド治療などの他の適切な臨床介入を行うことができる。急性反応が生じた場合、血清中の補体消費を評価する。薬物動態学的分析に必要なサンプリングのために第 2 の静脈内部位を使用する。

10

## 【 0 0 8 9 】

〔 評価可能な患者 〕

1 2 週間の治療中に 2 回しか非連続注入を逃していない任意の所与の患者由来のデータを評価可能と見なす。初期評価、中間点評価、および最終評価を完了させなければならない。

## 【 0 0 9 0 】

〔 安全性 〕

20

酵素の投与速度の変更または抗ヒスタミンもしくはステロイド使用の急性投与によって防止することができない有意な急性反応が生じない場合、酵素療法は安全であると決定する。臨床試験、臨床検査、または他の研究で有意な異常が認められない場合、酵素の長期投与は安全と決定する。抗体の存在または補体活性化自体が危険と見なされるが、このような抗体は E L I S A および免疫複合体病の可能性の臨床評価によるモニタリングが必要である。

## 【 0 0 9 1 】

〔 有効性 〕

本研究の 1 つの目的は、主試験のデザインのために潜在的評価項目を評価することである。代理および臨床評価項目の改良は、酵素の送達および体内からのグリコサミノグリカン貯蔵の除去の結果として予想される。平均の過剰尿中グリコサミノグリカンレベルが 3 ヶ月を超えて妥当な量が減少せず、且つ 3 ヶ月間有意な臨床上の利点が認められない場合に用量を増大させる。改善は、最近終了した M P S 第 1 相臨床試験で認められたものに匹敵すると予想され、気道指数または睡眠時無呼吸の解決、関節可動性の改善、および耐力の増大が含まれる。

30

〔 実施例 2 〕

## 【 0 0 9 2 】

M P S V I ネコについての利用可能な情報ならびに関連する薬理学適研究および毒物学研究の包括的再検討を以下に示す。ゴーシェ病、ファブリー病、およびムコ多糖体症 I などの種々の遺伝性代謝障害のための有望な治療として酵素代償療法を確立した。これらの障害のいくつかにおいて、天然の動物モデルにより前臨床研究時のヒト治療の臨床的有効性を予想することができる。M P S I ( イヌモデル ) においてこれは真であることが見いだされた。この点を考慮して、この疾患についてのヒト研究の開始前に M P S V I ネコを用いて研究を行った。ヒト M P S V I 患者における臨床試験を進めるにあたり、十分な安全性および有効性データが存在する。

40

## 【 0 0 9 3 】

r h A S B を用いた M P S V I ネコの研究は、薬物投与の結果として死亡したネコは存在しないことを示す。予想するように、M P S V I ネコにおける研究でも、r h A S B 取り込みがマンノース 6 リン酸修飾炭水化物側鎖の存在に依存することを示す。M P S V I ネコにおける r h A S B でも、種々の主要な器官から貯蔵物を除去し、骨密度を中

50

程度に変化させることが示された。長期投与量範囲有効性研究により、有意な臨床上的利点が認められる最も低い濃度は1 mg / kg / 週の用量であることが示唆される。ポラスおよび低速（2時間）注入後の酵素分布、組織グリコサミノグリカン貯蔵のクリアランス、および尿中グリコサミノグリカンレベルの減少を比較するための研究も行った。MPS VIを罹患したネコにおける1 mg / kgのrhASBの予測臨床用量の毎週の注入の安全性を評価するために研究を進行し続ける。

#### 【0094】

いくつかのシャムネコファミリーのMPS VIの自発的形態は1970年代に同定され(Jezyk, Science 198:834-36(1977))、これらの動物の病理学的変化の詳細なレポートが発表されている(Haskins, et al., Am. J. Pathol. 101:657-674(1980); Haskins, et al., J. Am. Vet. Med. Assoc. 182:983-985(1983); Konde, et al., Vet. Radiol. 28:223-228(1987))。これらのネコの臨床所見は幾らか異なるが、これらの変化は全て文献で報告されている一般的变化を示す。(Jezyk, et al., Science 198:834-36(1977); Konde, et al., Vet. Radiol. 28:223-228(1987); Crawley, 「Enzyme replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI」 PhD thesis, University of Adelaide, Adelaide, S. Australia, (1998))。表6を、非処置MPS VIネコで見いだされると予想される「平均的」変化が得られるようにこれらの源から構築した。

#### 【0095】

#### 【表9】

表7:MPS VI ネコモデル

臨床所見	発症のタイミング	ヒト疾患と比較した変化(時間と無関係)
・顔面形成異常: ・小頭 ・広い上顎 ・小さな耳	2ヶ月	・ヒト疾患に類似
・びまん性角膜混濁	2ヶ月	・ヒト疾患に類似
・骨の異常: ・骨端異形成症 ・不全脱臼 ・漏斗胸	2ヶ月目の最初の徴候—進行性	・ヒト疾患に類似 —内軟骨石灰化の変化
・体重の減少	3ヶ月	・ヒト疾患に類似
・頸椎可動性の減少	正常なネコの値は、全年齢で180°である。 MPS VIでは: 3ヶ月:130~170° 5ヶ月:45~130° 6ヶ月:30~100° 11ヶ月:20~80°	・ヒト疾患に類似
・骨粗しょう症／変形性関節疾患	1年またはそれ以上	・ヒト疾患に類似
・後肢歩行欠陥 ・後肢不全麻痺または麻痺(胸腰髄(thoracolumbar cord)の圧迫)	以下の表を参照のこと	・手根管症候群 ・C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> 不全脱臼 ・より典型的には頸髄の圧迫は硬膜肥厚に続発する
・非常に正常な肝臓および膵臓		・人手は肝臓および脾臓は肥大する
・心臓弁の肥厚		・ヒト疾患に類似
・CNS 損傷なし —側脳室の拡大		・ヒト疾患の水頭に匹敵し得る

#### 【0096】

他の生化学的／形態的決定因子は、35日目までに非処置ネコの器官の組織中のグリコ

10

20

30

40

50

サミノグリカンの貯蔵が最大となることを示す(Crawley,et al.,J.Clin.Invest.99:651-662(1997))。尿中グリコサミノグリカンレベルを正常なネコおよびM P S V Iネコの出生時に評価したが、約40日後、正常なネコのレベルは減少した。M P S V Iネコの尿中グリコサミノグリカンは、上昇したままであるか、約5ヶ月後の定常状態に達するまで増加し続ける。

【0097】

罹患同腹子において臨床所見の変化が認められる。特定の異常の発生のタイミングのいくつかの変動性に加えて、いくつかの臨床的および病理学的変化の進行の経時変化も変化し得る。さらに、典型的には、骨病変が進行するが(Konde et al.,Vet.Radiol.28:223-228(1987))、角膜混濁は進行しない。さらに、いくつかの麻痺したネコは、経時的に重篤な不全麻痺が改善することが認められた。各ネコにおける疾患の進行を詳述した研究は、臨床(またはX線写真の)所見に制限されない。これらのいくつかは、神経学的欠陥および胸腰領域における骨組織の増殖に続く髄圧迫などの明確な病理学的相関を示す(Haskins,et al.,J.Am.Vet.Med.Assoc.182:983-985(1983))。

10

【0098】

6ヶ月の有効性研究では、新生児M P S V Iネコにおける組換えネコA S Bを使用した代償療法を行った。これは、いくつかの処置されたM P S V Iネコがヒト酵素に対する抗体を産生したという所見によって促された(6.5節を参照のこと)。これらの抗体は、酵素の取り込みおよび安定性を変化させることができる(Brooks,et al.,Biochim.Biophys.Acta 1361:203-216(1997))。1mg/kgのネコ酵素を毎週注入した。研究の主な結論は、尿中G A G、体重/成長、骨の形態学、およびいくつかの組織からの貯蔵物質のクリアランスが以前の研究で使用された同用量のヒト組換え酵素と比較して改善されること、正常なネコで見いだされる範囲を超えた抗体が検出されること、および直接比較において疾患の逆転について1mg/kgのネコ酵素用量が5mg/kgのヒト酵素用量に匹敵することであった(Bielicki,et al.,J.Biol.Chem.,274:36335-43(1999))。これらの研究は、ネコ由来の酵素をネコに投与した場合に評価項目および免疫原性の改善を増大させることが可能であることを示す。これにより、1mg/kg/週のヒト酵素でのヒト患者の投与に対するさらなる支持が得られる。この研究結果を、表7に示す。

20

【0099】

## 【表 10】

表8:新生児 MPS VIネコにおけるCHO由来の組換えネコASBの毎週のボラス注射の有効性

用 量	結 果	
	1mg/kg	
持続時間	6ヶ月 (n=2)	3ヶ月 (n=3)
尿中 GAGS	正常値の2倍に減少	正常値の2倍に減少
抗体力価	・正常なネコで認められる範囲内	・未完了
<b>臨床的</b>		
外 観	・角膜混濁の持続 ・顔面形成異常がいくらか改善 ・体型の改善	・角膜混濁の持続 ・顔面形成異常がいくらか改善; ・体型の改善
体 重	・正常値よりも重い	・正常値よりわずかに軽い
脊椎可動性 (正常=180°)	160° ~180°	試験せず
神 経	・正常	・正常
放射線学	・骨の質、密度、および寸法の改善 (引用文献 10 における 1mg/kg の rh4S に類似)	・試験せず
<b>肉眼的</b>		
骨／軟骨の厚さ	・変化可能;軟骨の厚さの減少およびより一定の軟骨下骨(1mg/kg の rh4S <sup>a</sup> に類似)	・試験せず
脊 髄	・圧迫は存在せず	・試験せず
<b>細胞レベル</b>		
肝臓 (クップファー)	・リソソーム蓄積の完全な除去	・リソソーム蓄積の完全な除去
皮 膚	・蓄積のほとんど完全な減少	・軽度の減少
角膜／軟骨 (耳、関節)	・未処理 MPS・VIコントロールと比較して、リソソーム蓄積は除去されない	・リソソーム蓄積は除去されない
心臓弁	・リソソーム蓄積の有意な減少	・未完了
大動脈	・リソソーム蓄積のほとんど完全な減少	・リソソーム蓄積の軽度の減少

10

20

30

## 【0100】

表9は、MPS VIネコモデルにおける組換えヒトASBを使用して実施した全ての研究のまとめを提供する。

## 【0101】



【表 1 1】

表9:RhASBの研究結果

ネコの番号	用量	持続時間 (Mo.)	投与経路	尿中GAGS	組織病理学
1	0/8mg/kg/14 日	7～22	静脈内ボース	非処置ネコと比較して 50%減少  正常値付近まで減少	・肺の空洞形成の正常化 ・腎臓および皮膚における有意な減少 ・角膜および軟骨細胞は補正されず ・腎臓免疫複合体沈着はなし
	1.5mg/kg/7 日	22～27	静脈内ボース		
	0.5mg/kg/14 日	12～23	静脈内ボース		
	1.4mg/kg/7 日	23～27	静脈内ボース		
1	0.8mb/kg/14 日	2～15	静脈内ボース		
1	0.2mg/kg/8 日	6	静脈内ボース	非処置と比較して わずかな減少	N/A
4	1mg/kg/7 日	5/6	静脈内ボース	非処置の正常値の 10 倍と比較して減少し、 正常値の 3 倍に維持	・肝細胞におけるリソソーム蓄積の完全な除去 ・腎機能障害または糸球体免疫複合体沈着の証拠はなし ・心臓弁におけるリソソーム蓄積の有意な減少 ・大動脈の中膜から外膜への段階的蓄積内容物 ・皮膚(股関節、硬膜、腎臓)におけるリソソーム蓄積の軽度の減少 ・腎機能障害または糸球体沈着の証拠はなし ・角膜／軟骨のリソソーム蓄積の有意な変化はなし
		11	静脈内ボース		
2	5mg/kg/7 日	5/6	静脈内ボース	非処置の正常値の 10 倍と比較して減少し、 正常値の 2 倍に維持	・肝臓および皮膚(股関節、硬膜、腎臓)におけるリソソーム蓄積の完全な除去 ・腎機能障害または糸球体沈着の証拠はなし ・心臓弁におけるリソソーム蓄積のほぼ完全な減少 ・中膜の外膜側における空胞化細胞の細いバンド ・腎機能障害または糸球体沈着の証拠はなし ・心臓弁におけるリソソーム蓄積のほぼ完全な減少 ・中膜の外膜側における空胞化細胞の細いバンド
1		11	静脈内ボース		
2	0.5mg/kg を週 2 回	6	静脈内ボース	正常値の 3 倍に減少	・肝臓におけるリソソームの完全な除去 ・皮膚における軽度～中程度の減少 ・心臓弁におけるリソソーム蓄積の可変的減少 ・大動脈におけるリソソーム蓄積の軽度の減少
2	1mg/kg/7 日		長時間注入(2 時間)	第 1 または第 2 の 注入後に非処置 MPS VI ネコ未満に減少	・・回の注入後の細網内皮細胞におけるリソソーム蓄積の減少および心臓弁 および大動脈における非常に軽度の減少
2			短時間注入(10 分間)		
5	1mg/kg/7 日	6	長時間注入(2 時間)		

## 【 0 1 0 2 】

## [ 分布および実行可能性 ]

酵素の取り込みおよび分布を報告し、さらなる有効性研究のための潜在的評価項目のパイロット研究として役立たせるために最初の研究を行った(Crawley,et al.,J.Clin.Invest.97:1864-1873(1996))。ボラス注射によって罹患ネコに週 1 回または 2 週間毎に 1 回 0.5 mg / kg から 1.5 mg / kg までの組換えヒト A S B を投与した。値の比較により非処置 M P S V I ネコ ( C a t D ) および正常ネコを評価した。非処置ネコ由来のデータは、38 頭の非処置ネコの病歴の評価によってさらに支持された。正常なネコ酵素の存在下でヒト A S B の検出可能な免疫アッセイ技術を使用して、正常なネコにおける急激な取り込みおよび分布の研究を行った。

10

## 【 0 1 0 3 】

これらの研究により、主に、M P S 動物モデルにおける他の酵素代償研究で認められるように、広範に酵素が取り込まれ、肝臓および脾臓で主に取り込まれることが予想されると結論づけられた。取り込み効率は、酵素上のマンノース 6 リン酸修飾炭水化物側鎖の存在に依存していた。酵素の半減期は、2 ~ 4 日間であると決定された。治療的には、酵素は種々の主要器官から蓄積を除去せず、骨密度を中程度に変化させる。高齢の M P S V I ネコでは、角膜、骨形態学、および軟骨欠損症は有効に治療されなかった。研究結果を表 10 にまとめる。

## 【 0 1 0 4 】

## 【表 12】

表10:まとめ:分布/実行可能性MPS VIネコ研究

パラメーター	所 見				
ネコ	A		B		C
	処置 MPS VI		処置 MPS VI		処置 MPS VI
用 量	0.8mg/kg/ 14 日	1.5mg/kg/ 7 日	0.5mg/kg/ 14 日	1.4mg/kg/ 7 日	0.8mg/kg/14 日
投与時の年齢 (mo.)	7*~22	22~27	12*~33	23~27	2*~15
注入パラメーター	橈側皮静脈を介して 5~20 分間に 2~10ml (PBS)				
血漿 $t_{1/2}$ (静脈内ボーラス)	・・・m/kg で 13.7±3.2 分 .....m/kg で 45 分				
	全ての値は、正常なネコにおける 1mg/kg の rhASB 注入から 4 時間後の内因性ネコ ASB 酵素と比較している。 ・肝臓:495 倍 ・脾臓:6 倍 ・肺:22.3 倍 ・心臓:4.3 倍 ・大動脈:4 倍 ・皮膚:31 倍 ・軟骨:0 倍 ・角膜 0 倍				
組織 $t_{1/2}$	ほとんどの器官において 1mg/kg で 2~4 日間(酵素はネコ B のほとんどの組織で検出可能であるが、7 日後には肝臓のみで検出可能である)				
神 経	・歩行は不安定であるが、 より高い用量で改善する		N/A		・研究終了まで麻痺歩行に わずかに進行
角膜混濁	・治療による変化はなかった (処方薬 (rx) 投与後スリットランプ試験を 3 回行う)				
3mo.毎の4つの骨格 (X 線)	・病変が進行した(X 線写真における改善はなし) ・ネコ C において骨体積／骨梁数が増加した(初期に処方薬を投与) ・ネコCにおける脊椎圧迫				
過敏症	・過敏症なし、注入困難は最小；				
抗体応答 (Ig 力価) 非処置 MPS VI= 4,000~32,000	1×10 <sup>6</sup> (血漿はインビトロにおける 酵素活性を阻害することが できた)		64,000		64,000
尿中 GAGS (約 400 日)	・非処置ネコと 比較して 50%減少		・正常値付近まで減少		
尿中デルマトラン硫酸 (約 400 日)	・3 頭のネコ全てで中間 (非処置コントロール D および正常と比較して)				
体 重	・正常値 4~7kg に対して 2.5~3.0kg				
肝臓／脾臓	・肉眼的に正常				
心臓弁	・肉眼的に正常				
軟 骨	・異常な厚さおよび形態				
顕微鏡 (空胞形成)	・肺の空胞形成の正常化、 ・腎臓および皮膚における有意な減少、 ・角膜および軟骨細胞は補正されず				
腎臓免疫 複合体沈着	・存在せず				

## 【実施例 4】

## 【0105】

[MPS VIネコにおける出生時からの処置の有効性]

MPS VIネコの出生時から開始する長期の種々の用量による有効性の研究を行い(Crawley, et al., J. Clin. Invest. 99:651-662(1997))、表10にまとめる。MPS VIネコを、出生時から0.2、1、および5mg/kgのrhASBによる静脈内ボーラスで毎週処置した。全部で9頭のネコを5、6、または11ヶ月間処置した。さらに、非処置コントロールとして12頭のMPS VIネコおよび正常なネコを含んでいた。0.2mg/kgの用量は研究した1頭のネコでは疾患の進行が変化せず、唯一の報告された臨床上の利点は肝臓クップファー細胞中の蓄積の減少であることに主に結論づけられる。尿中GAGレベルは、より高い用量群における試験時にほぼ正常値まで減少した。主要器官の

改善に加えて、出生時からのより高用量の治療により脊椎の骨の奇形および多数の骨の異常な形態を防止または改善することができた。1 mg / kg ~ 5 mg / kg の用量で L - 5 椎骨無機質量、骨梁の厚さ、および骨表面密度の改善に用量依存性効果を示すが、5 ~ 6 ヶ月間の E R T での骨形成速度の改善は共に等価であった (Byers, et al., Bone 21:425-431(1997))。僧帽弁および大動脈は用量に依存し、1 mg / kg では完全ではないが、5 mg / kg でほぼ完全であった。いかなる用量においても軟骨および角膜の蓄積は改善されなかった。本研究により、1 mg / kg / 週の用量は有意な臨床上の利点を得るのに最も低い濃度であることが示唆される。研究結果を、表 1 1 に示す。

【 0 1 0 6 】

【表 1 3】

10

表 11: 新生 MPS VI ネコにおける CHO 由来の組換えヒト  
ASB の毎週のボラス注射の有効性 (研究 PC-BM102-002)

		結 果		
用 量	1mg/kg		5mg/kg	
持続時間	5/6 mo	11 mo	5/6 mo	11 mo
N	4	1	2	1
生 化 学				
尿 中 GAG	・非処置における正常の 10 倍と比較して 正常の 3 倍に減少し、維持された		・非処置における正常の 10 倍と比較して 正常の 2 倍に減少し、維持された	
臨 床 的				
外 観	・変動可能な変化； ・スリットランプによる角膜混濁の持続		・変動可能な変化； ・スリットランプによる角膜混濁の 持続	
体 重	・中間(処方薬なし対正常)		・中間(処方薬なし対正常)	
脊椎可動性 (正常=180°) (非処置 MPS VI=90°)	130~160°	90°	180°	160°
神 経	・4 頭中 1 頭が軽度 の後肢麻痺	・欠損なし	・欠損なし	・欠損なし
放射線学	・骨の質、密度、および寸法の改善		・骨の質、密度、および寸法の改善 ・おそらく 1mg/kg より優れている	
肉 眼 的				
骨／軟骨の厚さ	・変動するが、 改善される	・変形性関節疾患 が存在する	・変動するが、 改善される	・変形性関節疾患 が存在する
脊 髄	・4 頭中 1 頭がいくつ かの軽度の圧迫 を示す	・圧迫なし	・脊髄圧迫なし	
細胞レベル				
肝臓 (クップファー)	・リソソーム蓄積の 完全な除去	・維持	・リソソーム蓄積の 完全な除去	・維持
皮膚(股関節、硬 膜、腎臓)	・腎機能障害または 糸球体免疫複合 体沈着の証拠は なし	・リソソーム蓄積の 軽度の減少 ・腎機能障害また は糸球体沈着 の証拠はなし	・リソソーム蓄積の 完全な除去 ・腎機能障害また は糸球体沈着の証 拠はなし	・維持 ・腎機能障害または 糸球体沈着の証 拠はなし
角膜／軟骨 (耳、関節)	NA	・リソソーム蓄積に 有意な変化は なし	NA	・リソソーム蓄積に 有意な変化はな し
心臓弁	・リソソーム蓄積の 有意な(変動可 能な)減少	・リソソーム蓄積の ほぼ完全な有 意な(変動可能 な)減少	・リソソーム蓄積のほぼ完全な減少	
大動脈	・中膜から外膜への段階的蓄積内容物		・中膜の外膜側における空胞化細胞の細 いバンド	

20

30

40

【 実施例 5 】

【 0 1 0 7 】

[ 新生 MPS VI ネコにおける組換えヒト ASB の 1 週間に 2 回の注入の有効性 ]

50

1週間に2回0.5mg/kgの注入を評価するために、新生ネコにおいて6ヶ月間の研究を行った。さらに、本研究で使用した酵素は、排他的にCSL-4S-342細胞系統に由来する。本研究では、主に、前に報告した毎週1mg/kgの用量と比較した結果、本研究により、物理的、生化学的、神経学的、および放射線学的パラメーターが同様に改善されると結論づけられる。最も顕著な相違は、頸椎可動性のわずかな悪化ならびに心臓弁および大動脈などのより緻密な結合組織中のリソソーム蓄積のクリアランスの低さであった。結果を、表12にまとめる。

【0108】

【表14】

表12:新生MPS VIネコにおけるCHO由来の組換えヒト

ASBの週2回ののボラス注射の有効性

パラメーター	結 果
用 量	0.5mg/kg
持続時間	週2回:6ヶ月(n=2;ネコ225f、226m)
尿中GAG	・正常の3倍に減少
抗体力価	・正常なネコで認められる範囲内
臨床的	
外 観	・角膜混濁の持続 ・顔面形成異常がいくらか改善 ・体型の改善
体 重	・中間(処置なしと正常との間)
脊椎可動性(正常=180°)	90°~150°
神 経	・後肢麻痺なし
放射線学	・骨の質、密度、および寸法の改善 (引用文献110における1mg/kgのrh4Sに類似)
肉眼的	
骨/軟骨の厚さ	・変化可能;軟骨の厚さの減少およびより一定の軟骨下骨 (1mg/kgのrh4Sに類似)
脊 髄	・圧迫は存在せず
細胞レベル	
肝臓 (クップファー)	・完全なリソソームの除去
皮 膚	・軽度~中程度の蓄積の減少
角膜/軟骨 (耳、関節)	・未処理MPS・VIコントロールと比較して、リソソーム蓄積は除去されない
心臓弁	・リソソーム蓄積の変動可能な減少(225fにおいては完全;226mにおいては非処置では変化なし)
大動脈	・リソソーム蓄積の軽度の減少

【実施例6】

【0109】

【MPS VIネコにおける酵素注入速度の関数としての酵素取り込みおよび分布の評価】

本研究の主な目的は、ボラス注入および同一の1mg/kgの用量の低速(2時間)注入後の酵素分布、組織GAG蓄積、および尿中GAGレベルの減少を比較することである。低速投与の提案は、MPS I処置のための-L-イズロニダーゼの前臨床研究および臨床研究由来の経験に基づく。さらに、本研究により、細胞系統CSL-4S-342からBioMarin社で産生された酵素が生物学的に活性であり、且つ安全であるという第1のデータが得られた。本研究により、主に、本研究で処置された4頭全てのネコ(2頭/群)が低速または高速注入のいずれかに対して急性副作用を示さず、且つ酵素の反復注入による有害な影響はないと結論づけられる。しかし、ボラス注入により、肝臓への取り込みが多くなり、これは好ましくない。低速注入により、組織に良好に分布され、それにより臨床試験に好ましい方法である。

【0110】

本研究で得られたrhASBの組織分布により、2時間の注入により、肝臓から離れた

他の器官の酵素レベルが増加する（脳内の活性増加が含まれる）ことが示唆された。第1および第2の注入の直後に非処置MPS-VIネコで認められた範囲未満の尿中GAGの減少が認められた。細網内皮細胞でリソソーム蓄積の相関が認められ、5回の注入後にいくつかの線維芽細胞（心臓弁）および平滑筋細胞（大動脈）で非常に軽度で認められた。注入に対する他の有意な臨床反応がいずれかの群でも認められないが、研究機関の短さおよび有意な疾患がすでに発症した後から開始したことによりこれは意外なことではない。2時間の注入の延長は安全であり、前の研究で使用したより短いプロトコールと比較しても十分に許容される。2時間の注入により、酵素組織分布について評価可能な1頭のネコに基づいて酵素分布を改善することができる。

〔実施例7〕

10

【0111】

〔MPS-VI罹患ネコにおける組換えヒトN-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼの6ヶ月の安全評価〕

本発明の製造プロセスによって生産された酵素を使用して、MPS-VIネコにおける2回の6ヶ月研究を開始した。これらの研究の目的は、MPS-VIを罹患したネコにおける計画されたヒト臨床用量のrhASBの毎週の注入の安全性および有効性を評価することである。研究6は、最初に3～5月齢の子ネコへの投与を含む。研究7は、出生時から子ネコに毎週計画されたヒト臨床用量のrhASBの注入を含む。本研究は、潜在的な毒性の評価を意図する。免疫応答の可能性を評価するために、組換え酵素の注入中の挙動の変化についてネコを観察する。補体枯渇および組換え酵素に指向する抗体の形成について血清をモニタリングする。完全な臨床化学パネル（腎機能および肝機能）、尿検査、および完全血球算定（CBC）の相違によって全体的な器官機能をモニタリングする。酵素注入に対する設定測定点で尿中グリコサミノグリカンレベルを毎週モニタリングする。疾患の臨床的改善の証明を報告する。これらのデータにより、処置の潜在的有効性をさらに評価し、インビボでの酵素の活性および取り込みを立証する。本研究を、できる限りGLP規則の原理および業務に一致する様式で行い、以後も行う。

20

【0112】

第1の研究の予備段階の結果は、rhASBの投与により、いかなる動物に対してもいかなる有害な影響を与えず、体重および臨床化学は一般に基準範囲内で維持されることを示す。しかし、抗体力価が有意に増大した両方のネコは注入時に異常な臨床的徴候を示したが、一旦酵素注入を中止すると、両動物は正常に挙動し、長期間罹患しないようであった。長期間注入（4時間）および前投薬抗ヒスタミンの増量により、ネコにおいていかなる異常な臨床的徴候も示すことなく治療を継続することが可能である。尿中GAGレベルのわずかな減少により、組織または循環における蓄積グリコサミノグリカンの減少において治療が幾らか有効であるか示唆されるが、長期的にはこれらのレベルは変動し、解釈が困難である。5頭のネコはERTに対する応答に明確な臨床的改善が認められないが、以前の研究に基づいて<sup>23</sup>、これには少なくとも6ヶ月の処置が必要である。5頭のネコのうち4頭で抗体力価が発生し、力価の顕著な増加は、ERTの2ヶ月後に認められた。これらのネコのうちの2頭の力価は2または3ヶ月後に有意に増加した。

30

〔実施例8〕

40

【0113】

〔rhASBで処置したMPS-VIネコの安全プロフィール〕

生後24時間以内に処置した登録罹患ネコに対して研究を開始した。rhASBを用いて41頭のMPS-VIネコを処置した。有益な罹患動物の治療への暴露前に新規のバッチの急性安全性を確認するために、2頭のネコのうちの1頭に対して正常なネコへの酵素の投与を制限した。まとめると、薬物投与の結果としてMPS-VIネコは死亡しなかったが、4頭のネコはウイルス感染または潜在的な先天性異常の結果として死亡した。本発明の生産方法にしたがって、研究用酵素を生産した。予備データを表13に示す。

【0114】

## 【表 15】

表 13: Hopwood 研究所における MPS VI ネコの有効性研究のまとめ

研究 番号	ネコの数	用量/wk (mg/kg)	投与期間 (mos.)	死亡率
1	2	変動性	13~21	なし
	1			
2	1	0.2	5	なし
2	1	0.2	1	死亡: 先天性の心臓の欠陥
-	2	0.5	3~5	パルボウイルスにより 1 頭死亡
2	4	1	3~11	パルボウイルスにより 1 頭死亡
	2			
-	1	1	6(皮下)	なし
-	4	1	6	なし
2	2	5	3~11	パルボウイルスにより 1 頭死亡
	2			
4	2	0.5(2 回)	5	なし
-	3	0.5(2 回)	5	なし
5	4	1	1	なし
6	5	1	開始	なし
7	5	1	開始	なし

〔実施例 8 A〕

## 【0115】

〔低速注入での組織分布〕

長時間注入（2 時間）または短時間注入（10～15 分間）プロトコル（ASB - PC - 004）を使用して、幼若 MPS VI ネコ（開始時 10 週齢未満）における rhASB の取り込み速度および組織分布を比較するために、個別の研究を行った。7 頭の正常なネコ（12～24 月齢）を落ち着かせ、採血するために大腿動脈カニューレを移植した。撓側皮静脈に 7 mL の体積の 1.0 mg/kg または 7.3 mg/kg の用量の rhASB を 40 秒間注入した。投与から約 2、4、6、8、10、20、30、40、60、および 120 分後に連続ヘパリン添加動脈血サンプルを得た。遠心分離によって血漿を回収し、分析まで凍結した。4 時間後、動物を安楽死させ、組織を回収し、秤量し、分析まで凍結した。

## 【0116】

個別の研究では、3 頭の正常なネコ（8～66 月齢）に、7 mL の体積の 1.0 mg/kg の用量の rhASB を静脈内ボラスで投与した。投与から 2、4、または 7 日後に測定点あたり 1 頭のネコを安楽死させた。選択組織を回収し、秤量し、分析まで凍結した。分析を比較するための組織中のネコ ASB レベルを得るために、rhASB に暴露していない 1 頭のさらなる正常なネコを安楽死させた。ELISA アッセイ技術を使用して、血漿中および組織中の rhASB またはネコ ASB を定量した。サンプル中の rhASB を固定化抗 rhASB モノクローナル抗体に吸着させ、ネコ ASB をネコ ASB と交差反応するポリクローナル抗 rhASB 抗体に吸着させた。次いで、蛍光基質を使用して吸着した ASB を定量した。

## 【0117】

血漿濃度分析は、1.0 mg/kg の用量の rhASB の半減期は  $13.7 \pm 3.2$  分間であり、7.3 mg/kg の用量では約 45 分間であることを示した。1.0 mg/kg の投与後の組織の半減期は、肝臓、脾臓、肺、腎臓、および心臓で 2.4～4.2 日の範囲であった。投与から 7 日後までにこれらの組織（心臓以外）で低レベルであるが検出可能なレベルが認められた。1.0 mg/kg の ASB の投与から 4 時間後、肝臓に送達された大部分の用量は、軟骨および角膜以外の全組織で検出され、肝臓が大部分を占めた。大脳および小脳以外で、非処置コントロールネコ中のネコ ASB レベルよりも 4 倍（大動脈）～495 倍（肝臓）高かった。本研究で決定された組織半減期（1.0 mg/kg で 2.4～4.2 日間）は、毎週の臨床投与頻度を支持する。

## 【0118】

本研究の主な目的は、酵素分布、組織 G A G 蓄積のクリアランス、および尿中 G A G レベルの減少における注入速度を評価することであった。10 週齢の M P S V I ネコ群 (n = 2 / 群) に、1 . 0 m g / k g の r h A S B を週 1 回 5 週間にわたり短時間 (10 ~ 15 分間) または長時間 (2 時間) 静脈内注入した。最後の注入から 2 日後に動物を安楽死させ、A S B 活性の決定および組織病理学的評価のために、選択組織 (肝臓、脾臓、心臓、肺、腎臓、皮膚、大動脈、大脳、小脳、軟骨、角膜、およびリンパ節) を回収した。分析まで組織を凍結して保存した。研究では、組織 A S B レベルを決定するために上記と同一の免疫アッセイ (A S B - P C - 001) を使用した。2 時間注入群中の 1 頭のネコは、他の処置ネコと比較して組織酵素レベルが減少した。最後の投与後にカテーテル挿入部位付近で高レベルの酵素が検出される一方で、対側肢では低レベルで認められた。これらの所見により、早期にカテーテルを取り外したことがこの動物由来の組織中で認められた A S B の組織レベルの低さに寄与することが示唆される。残りの 3 頭のネコにおける酵素活性の比較により、10 分間の注入動物と比較した 2 時間の注入ネコの肝臓、肺、腎臓、大脳、および小脳での酵素活性が増加し、腸間膜リンパ節での活性が減少することを示された。皮膚、軟骨、および角膜で酵素は見出されなかった。本研究由来のデータは限られているが、本研究由来の所見により、2 時間の注入により、10 分間の注入と比較して組織 (肝臓以外) 中の酵素レベルを増大することができることが示唆され、長期注入によってより良好な組織分布が得られることを示す。

10

〔実施例 9〕

【0119】

20

〔製造および精製方法 (灌流プロセス)〕

フェッドバッチのための精製プロセスと灌流ベースの細胞培養プロセスとを比較したプロセスの流れ図を表 14 に示す。フェッドバッチ精製プロセスとの比較および灌流精製プロセスのために実施された材料の特定の変更の詳細を表 15 にまとめる。表 16 は、灌流ベースの細胞培養で使用した精製方法を示す。

【0120】



【表 16】

表 14: バッチプロセスと灌流プロセスとの精製プロセスの比較



10

20

30

【 0 1 2 1 】

【表 17 A】

表 15: 精製の変更点の説明のまとめ

産生工程	説明 (バッチ)	説明 (灌流)
精製プロセス		
濃縮／ ダイアフィルトレーション	クロスフロー濾過: 2.8m <sup>2</sup> アルブミン保持 MWCO フィルター 操作: ・ 10 倍濃縮 ・ 5 倍体積の 10mM リン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム (pH7.3) に対してダイアフィルトレーションを行う	変更: クロスフロー濾過: 5.6m <sup>2</sup> アルブミン保持 MWCO フィルター 操作: ・ 20 倍濃縮 ・ ダイアフィルトレーションを行わず、系を 100 mM リン酸ナトリウム (pH7.3) でリンスする 原理: ・ 4℃での保存のために体積を減少させる
↓		
DEAE Sepharose FF Flow-Through クロマトグラフィ	カラム: 直径 30cm × 高さ 33cm を 2 つ ・ 予洗液: 0.1 N 水酸化ナトリウム ・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI) ・ 中和: 100mM リン酸ナトリウム (pH7.3) ・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム、100mM 塩化ナトリウム (pH7.3) ・ ロード: 濃縮／ダイアフィルトレーションした回収物 ・ 洗浄: 10mM リン酸ナトリウム、100mM 塩化ナトリウム (pH7.3) ・ ストリップ: 10mM リン酸ナトリウム、1.5M 塩化ナトリウム (pH7.3) ・ 再生: 10%氷酢酸 ・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI) ・ 浄化: 0.5N 水酸化ナトリウム ・ 保存: 0.1N 水酸化ナトリウム	工程を削除した
↓		
pH 調整および 濾過		・ pH の調整: 10%氷酢酸をプールした 20 倍濃縮物に最終 pH5.0 まで添加 ・ ロード: プールした 20 倍濃縮物 ・ 清澄化フィルターおよび 0.2μm フィルターでの濾過 ・ フラッシュ: 20mM 酢酸ナトリウム、120 mM 塩化ナトリウム (pH5.0) 原理: ・ その後の Blue Sepharose 樹脂カラムの rhASB 結合能力を増大させる
↓		
Blue Sepharose FF クロマトグラフィ	カラム: 直径 20cm × 高さ 11cm ・ 予洗液: 0.1 N 水酸化ナトリウム ・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI) ・ 中和: 1 M 酢酸ナトリウム (pH5.5) ・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.5) ・ ロード: 20mM 酢酸ナトリウム、	変更: カラム: 直径 45cm × 高さ 16cm  ・ 中和: 省略 ・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム (pH6.45) ・ ロード: pH を 5.0 に調整し、濾過したプールした 20 倍濃縮物

10

20

30

40

【表 17B】

	150mM 塩化ナトリウム (pH5.5) で調整した DEAE 灌流物 ・ 洗浄: 20mM 酢酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.5) ・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、500mM 塩化ナトリウム (pH5.5) ・ 再生: 20mM 酢酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH5.5) ・ 浄化: 0.1N 水酸化ナトリウム ・ 洗浄 1: 注射用蒸留水 ・ 洗浄 2: 1M 酢酸ナトリウム (pH5.5) ・ 保存: 20%エタノール	・ 洗浄: 10mM リン酸ナトリウム (pH6.45) ・ 溶離: 10mM リン酸ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム (pH6.45) ・ 再生: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45) ・ 洗浄 2: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45) 原理: ・ 条件により DEAE Sepharose クロマトグラフィの検出が可能な潜在的 CHO 夾雑物の除去が改良される。
↓		
Copper Chelating Sepharose FF クロマトグラフィ	カラム: 直径 14cm × 高さ 9cm ・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム ・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI) ・ チャージ緩衝液: 0.1M 硫酸銅 ・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH6.0) ・ ロード: 20mM 酢酸ナトリウム、500mM 塩化ナトリウム、50% グリセロール (pH6.0) の添加によって Blue 溶離物のグリセロール含有率を 10% に調整する ・ 洗浄 1: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH6.0) ・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH4.0) ・ 洗浄 3: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.8) ・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.6) ・ 再生: 50mM EDTA, 1.0 M 塩化ナトリウム (pH8.0) ・ 浄化: 0.5M 水酸化ナトリウム ・ 保存: 0.1M 水酸化ナトリウム	変更: カラム: 直径 40cm × 高さ 16cm ・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH5.5) ・ ロード: 100mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム、50% グリセロール (pH5.2) の添加によってプールした Blue 溶離物のグリセロール含有率を 10% に調整する ・ 洗浄 1: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH5.5) ・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.9) ・ 洗浄 3: 省略 原理: ・ 修正工程を使用して、一貫性があり且つ再現性のある産生物の純度を得る
↓		
ウイルスの不活化	0.5M NaOH で pH4.5 に調整する前に、プールした溶離画分 30~120 分保持する	変更なし
↓		
Phenyl Sepharose クロマトグラフィ	カラム: 直径 10cm × 高さ 16cm 樹脂: Phenyl Sepharose High Performance	変更: カラム: 直径 40cm × 高さ 16cm 樹脂: Phenyl Sepharose High Sub Fast Flow

10

20

30

40

【表 17C】

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液 : 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄 : 注射用蒸留水(WFI)</li> <li>・ 平衡化 : 20mM 酢酸ナトリウム、3.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ ロード : 20mM 酢酸ナトリウム、5 M 塩化ナトリウム (pH4.5) の添加によって Copper 溶離物の塩化ナトリウム含有量を 3M に調整する</li> <li>・ 洗浄 1 : 20mM 酢酸ナトリウム、3.0 M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 洗浄 2 : 20mM 酢酸ナトリウム、1.6 M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 溶離 : 20mM 酢酸ナトリウム、1 M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 再生 : 20 mM 酢酸ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 浄化 : 0.5N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 保存 : 0.1N 水酸化ナトリウム</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化 : 20mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ ロード : 20mM 酢酸ナトリウム、5 M 塩化ナトリウム (pH4.5) の添加によって Copper 溶離物の塩化ナトリウム含有量を 2M に調整する</li> <li>・ 洗浄 1 : 10mM リン酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH7.1)</li> <li>・ 洗浄 2 : 20mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 溶離 : 20mM 酢酸ナトリウム、250mM 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> </ul> <p>原理 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 代替樹脂は、rhASB のためのより好ましい流れの特徴および容量を有する。</li> <li>・ 洗浄 1 により、潜在的なタンパク質夾雑物がより強力に除去される。</li> </ul>
↓		
最終 UF/DF	<p>クロスフロー濾過 : 0.4m<sup>2</sup> 未満の MWCO 10kDa フィルター</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化 : 10mM リン酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> <li>・ 濃縮 : NMT1.5mg/mL に濃縮</li> <li>・ ダイアフィルトレーション 10 mM リン酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> </ul>	<p>変更 :</p> <p>クロスフロー濾過 : 2.8m<sup>2</sup> の MWCO 10kDa フィルター</p>
↓		
DNA 除去	実施せず	<p>新規の工程 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ DNA 濾過 : 産生物をイオン交換ベースの DNA フィルターで濾過した</li> </ul> <p>原理 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ DEAE Flow-Through クロマトグラフィ工程の削除を補うためのさらなる DNA クリアランス</li> </ul>
↓		
処方	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 10mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム (pH5.8) で 1.0mg/ml に希釈する</li> </ul>	
↓		
ウイルス濾過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ウイルス濾過 : 産生物を 0.04μm フィルターで濾過した</li> </ul>	<p>変更 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ウイルス濾過 : 産生物を 0.02μm フィルターで濾過した</li> </ul> <p>原理 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ウイルスクリアランスを強化するためにより小さな孔サイズを使用する</li> </ul>
↓		
処方	プロセスのより早い時期に本工程を行う	<p>変更 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 10mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム</li> </ul>

10

20

30

40

【表 17D】

	(ウイルス濾過前)	リウム(pH5.8)で 1.0mg/ml に希釈する ・処方: 50µg/mL の濃度までポリソルベート 80 を添加する。
	↓	
濾過	・ 濾過: 希釈産生物を 0.2µm フィルターで保存コンテナに濾過する	変更なし

【0122】

10

【表 18A】

表 16: rhASB の精製方法 (灌流プロセス)

工程	プロセス	
回収濾過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 清澄化フィルター、0.45µm フィルター、最後に 0.2µm フィルターでの濾過</li> <li>・ 濾過したプール回収物を、ポリプロピレンバッグ中で保存する</li> </ul>	
UF 濃縮	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化およびフラッシュ: 100mM リン酸ナトリウム (pH7.3)</li> <li>・ ロード: 濾過した回収流動物</li> <li>・ 濃縮: 20 倍濃縮</li> <li>・ 濾過: 希釈産生物を 0.2µm フィルターで保存コンテナに濾過する</li> </ul>	
pH 調整および濾過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ pH の調整: プールした 20 倍濃縮物に最終 pH5.0 まで 10% 氷酢酸を添加する</li> <li>・ ロード: プールした 20 倍濃縮物</li> <li>・ リンス: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 清澄化フィルターおよび 0.2µm フィルターで濾過する</li> <li>・ フラッシュ: 20mM 酢酸ナトリウム、120mM 塩化ナトリウム (pH5.0)</li> </ul>	20
Blue Sepharose 6 FF (Blue, Blue Sepharose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ ロード: pH を調整し、プールした 20 倍濃縮物を濾過する</li> <li>・ 洗浄: 10mM リン酸ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 溶離: 10mM リン酸ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 再生: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 浄化: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄 1: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 洗浄 2: 10mM リン酸ナトリウム、1.0M 塩化ナトリウム (pH6.45)</li> <li>・ 保存: 20% エタノール</li> </ul>	30
Chelating Sepharose FF (Copper, GC, Copper-Chelating)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ チャージ緩衝液: 0.1M 硫酸銅</li> <li>・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH5.5)</li> <li>・ ロード: 100mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム、50% グリセロール (pH5.2) の添加によってプールした Blue 溶離物のグリセロール含有率を 10% に調整する</li> <li>・ 洗浄 1: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH5.5)</li> <li>・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.9)</li> <li>・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、0.5M 塩化ナトリウム、10% グリセロール (pH3.6)</li> <li>・ 0.5M NaOH で pH4.5 に調整する前に溶離物を 30~120 分間保持する</li> <li>・ 再生: 50mM EDTA、1.0M 塩化ナトリウム (pH8.0)</li> <li>・ 浄化: 0.5M 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 保存: 0.1M 水酸化ナトリウム</li> </ul>	40
Phenyl Sepharose 6 FF High Sub (Phenyl, Phenyl High Sub)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 予洗液: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 洗浄: 注射用蒸留水 (WFI)</li> <li>・ 平衡化: 20mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ ロード: 20mM 酢酸ナトリウム、5M 塩化ナトリウム (pH4.5) の添加によって Copper 溶離物の塩化ナトリウム含有量を 2M に調整する</li> <li>・ 洗浄 1: 10mM リン酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH7.1)</li> <li>・ 洗浄 2: 20mM 酢酸ナトリウム、2.0M 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 溶離: 20mM 酢酸ナトリウム、250mM 塩化ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 再生: 20mM 酢酸ナトリウム (pH4.5)</li> <li>・ 浄化: 0.5N 水酸化ナトリウム</li> <li>・ 保存: 0.1N 水酸化ナトリウム</li> </ul>	

50

【表 18B】

工程	プロセス
UF/DF、 DNA 濾過、 ウイルス濾過、処方	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平衡化: 10mM リン酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> <li>・ 濃縮: NMT1.5 mg/mL に濃縮</li> <li>・ ダイアフィルトレーション 10mM リン酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム (pH5.8)</li> <li>・ DNA 濾過: 産生物を DNA フィルターで濾過する</li> <li>・ ウイルスの濾過/希釈: 産生物を 0.02µm フィルターで濾過し、1.0mg/ml まで希釈する</li> <li>・ 処方: 50µg/mL の濃度のポリソルベート 80 を添加する</li> <li>・ 濾過: 希釈産生物を 2.0µm フィルターで保存コンテナに濾過する</li> </ul>

10

## 【0123】

表 15 および 16 に示すように、全ての精製カラムを使用前に再生し、使用後に浄化し、適切な緩衝液中で保存する。

## 【0124】

## [ 精製原料 ]

全ての材料を、認定ベンダーから入手する。

## 【0125】

## 【表 19】

表 17: 精製用原料

20

成分	グレード
氷酢酸	USP
硫酸銅 (5 水和物)	USP
エデト酸二ナトリウム	USP
脱水アルコール、USF (エタノール、アルコール度数 200)	USP
グリセリン	USP
酢酸ナトリウム (3 水和物)	USP
塩化ナトリウム	USP
水酸化ナトリウム (50%w/w 溶液)	試薬グレード
ニリン酸ナトリウム (7 水和物)	USP/EP
リン酸二水素ナトリウム (1 水和物)	USP
塩酸 (6N 適定液)	試薬グレード
ポリソルベート 80、MF/EP (CRILLE 4HP)	NF/EP
注射用蒸留水 (バルクパッケージ)	USP

30

40

## 【0126】

使用すべきグリセリンは、合成プロセスに由来する。使用した全ての原料は、高温高圧条件や、牛海綿状脳症 (BSE) 因子に最終的に有害であることが公知の化学反応を含む厳密なプロセスによって製造されるグリセロールおよび脂肪酸などの獣脂誘導体が、感染性である可能性は低いと考えられる「Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human and Veterinary Medicinal Products」というタイトルのガイダンスについての C P M P / C V M P 注記の最新バージョンに従うべきである。したがって、グリセリン由来の BSE 伝播リスクは低いと見なされる。

## 【0127】

ベンダーの選択および資格、原料の試験、細胞バンクの特徴づけ研究、r h A S B 精製

50

プロセスのウイルス除去研究および不活化能力、ならびに日常的なロット許可試験の組み合わせによって r h A S B のウイルス安全性を確認する。r h A S B のウイルス安全性を確実にするために、関連する米国、欧州、および I C H の規則およびガイドラインを参照した。

#### 【 0 1 2 8 】

[ カラムクロマトグラフィ、DNA 除去、およびウイルス濾過 ]

ここでは一連のクロマトグラフィおよび濾過ステップを使用して r h A S B を精製する。回収した流動物を限外濾過によって 2 0 倍に濃縮し、p H を調整し、濾過し、Blue Sepharose Fast Flow クロマトグラフィカラム ( 4 5 c m × 1 6 c m ) にロードする。Blue Sepharose Fast Flow 流動物を濾過し、その後 Copper Chelating Sepharose カラムにロードする。Copper 溶離物を濾過し、その後 Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub カラムにロードする。3 つ全てのカラムクロマトグラフィ精製ステップを、結合および溶離モードで運転する。Phenyl Sepharose カラム溶離物を、陰イオン交換フィルターおよびウイルス減少フィルターに通し、その後濃縮し、限外濾過によって緩衝液を交換する。

10

#### 【 0 1 2 9 】

[ ウイルス除去 / 不活化研究 ]

修正 r h A S B 精製プロセスのウイルス減少能力を評価するために、2 つの研究を行った。2 つのモデルウイルス系 ( キセノトロピックマウス白血病ウイルス ( X M u L V ) およびマウス微小ウイルス ( M M V ) ( Murine Minute Virus ) ) を使用した BioReliance ( Rockville, MD ) で研究を行った。X M u L V は、物理化学的相互作用に対する耐性が低い包膜一本鎖 R N A レトロウイルスである。M M V は、物理化学的因子に高い耐性を示す小さな非包膜一本鎖 D N A ウイルス。

20

#### 【 0 1 3 0 】

これらの研究は、2 つのクロマトグラフィステップ ( Copper Chelating Sepharose FF および Phenyl Sepharose FF High Sub ) を評価し、r h A S B 精製プロセスでウイルスフィルター ( 0 . 0 2 μ m ) を使用した。プロセスステップの縮小バージョンを使用して、スパイクおよび回収研究を行った。維持された重要なパラメーターは、保持時間およびマトリクス - 溶液相互作用であった。緩衝液の置換、線形流速、およびカラムの高さ ( しかしカラム直径を調整 ) によってこれを行った。本研究で使用了材料 ( 生産物および緩衝液 ) を、実際の実寸大の生産から回収した。

30

#### 【 0 1 3 1 】

クロマトグラフィカラム ( Copper Chelating Sepharose および Phenyl Sepharose ) を封入し、典型的な r h A S B ロード ( ブランク ) または BioReliance への輸送前にウイルス緩衝液を使用してスパイクしたロードのいずれかを使用して予備運転を行った。ウイルス緩衝液の存在下でのクロマトグラムおよび生産物の収率は、ブランク運転と類似していた。クロマトグラフィの直前に X M u L V または M M V を使用して、同一のカラムロードをスパイクした。それぞれの評価されたステップについてのウイルス減少量を、カラムロードおよび溶離物中のウイルス負荷の比較によって決定した。本研究結果のまとめを表 1 8 に示す。

#### 【 0 1 3 2 】

40

## 【表 2 0】

表 18: XmuLVおよびMMVの減少因子

プロセス工程	XMuLV 対数減少	MMV 対数減少
Blue Sepharose	試験せず	試験せず
Copper Chelating (+低 pH に保持)	$\geq 3.51 \pm 0.52$	$\geq 2.71 \pm 0.52$
Phenyl Sepharose	$\geq 3.54 \pm 0.36$	$\geq 1.72 \pm 0.64$
DNA 濾過	試験せず	試験せず
ウイルス濾過	$\geq 5.51 \pm 0.43$	$\geq 4.76 \pm 0.00$
総対数減少	$\geq 12.56$	$\geq 9.19$

10

## 【0 1 3 3】

## [ プロセス中の試験 ]

プロセスを通してプロセス中の試験を行い、図 3 に例示する。回収細胞培養流動物および精製中間体のプロセス中の試験を、表 1 9 および 2 0 に記載する。

## 【0 1 3 4】

## 【表 2 1】

20

表 19: プロセス中の回収した細胞培養流動物の試験

試 験	作用レベル
LAL による最近内毒素 (USP/EP)	$\geq 2\text{EU/mL}$
生物汚染度 (USP/EP)	$\geq 1\text{cfu/10mL}$
Bradford および活性による総タンパク質	Blue Sepharose カラムロードの計算に 使用した結果
マイコプラズマ <sup>1</sup>	陰性 (許可規格 (Release Specification))
ウイルス夾雑物の存在についての インビトロアッセイ <sup>1</sup>	陰性 (許可規格)

30

<sup>1</sup> 製造における細胞培養物回収工程の複数の測定点でサンプリングを行う。

細胞培養プロセスの終了前に取り出した最後のサンプルを試験し、ロット許可のために負の結果が必要である。

40

## 【0 1 3 5】



## 【表 2 2】

表 20: プロセス中の精製中間体の試験

試 験	作用レベル
LAL による細菌内毒素 (USP/EP)	カラム溶離物中に 3EU/mL 以上 <sup>1</sup>
生物汚染度 (USP/EP)	濾過前で 20cfu/mL 以上 <sup>1</sup>
	処方したバルク製剤原料 (FBDS) において 1cfu/100 mL 以上 <sup>2</sup>
活性	Copper Chelating および Phenyl Sepharose カラムロードの計算のために使用した結果
UV-可視分光光度法による総タンパク質	UF/DF のタンパク質濃度の計算のために使用した結果

<sup>1</sup> 標準操作手順あたり作用レベルを超える結果を調査する。

<sup>2</sup> 結果が作用レベルを超える場合、FBDS を 0.2µm フィルターで適切な滅菌保存コンテナに濾過し、その後、充填場への輸送のために許可されるまで隔離する。

10

## 【 0 1 3 6 】

[ 前駆体 r h A S B の灌流精製方法の結果 ]

表 2 1 は、表 1 5 および 1 6 に記載の精製方法を使用して得た r h A S B の純度についてのデータを示す。「R P - H P L C」カラムによる純度は、r h A S B の前駆体と成熟形態の両方の組み合わせた量について得た純度を示す。

## 【 0 1 3 7 】

20

## 【表 2 3】

表 21: rhASB ロットの許可結果

ロット	RP-HPLC による 純度	プロセシング形態の 存在 *	製造プロセス
AP60028	99.6	—	バッチプロセス
AP60029	98.8	+	バッチプロセス
AP60030	98.7	+	バッチプロセス
AP60031	99.1	—	バッチプロセス
AP60032	99.8	—	バッチプロセス
AP60033	99.4	—	バッチプロセス
AP60035	98.7	—	バッチプロセス
AP60036	99.4	—	バッチプロセス
AP60038	99.6	—	バッチプロセス
AP60039	99.3	—	バッチプロセス
AP60040	99.1	—	バッチプロセス
AP60101	99.3	—	バッチプロセス
AP60102	98.9	—	バッチプロセス
AP60103	99.0	—	バッチプロセス
AP60104	99.0	+	バッチプロセス
AP60105	99.0	—	バッチプロセス
AP60106	99.2	—	バッチプロセス
AP60107	99.4	—	バッチプロセス
AP60108	99.7	—	灌流プロセス
AP60109	99.8	—	灌流プロセス
AP60201	99.0	N/A	灌流プロセス
AP60202	100	—	灌流プロセス

\* 「+」は処方したバルク製剤原料のプロセシング形態 (1~15%と評価) を示し、「—」はプロセシング形態の非存在を示す。

## 【 0 1 3 8】

図 4 A ~ 4 C は、灌流精製方法の 3 つのクロマトグラフィステップの代表的クロマトグラムを示す (表 1 6)。表 2 2 は、3 つの各クロマトグラフィステップの前駆体 rhASB の平均回収率を示す。図 5 は、各クロマトグラフィステップのプロセス中のサンプルおよび精製最終生産物の純度分析についてのデータを示す (前駆体 rhASB)。

## 【 0 1 3 9】

## 【表 2 4】

表 22: 精製収率のまとめ

工 程	平均収率(%)
pH 5.0 に調整	83
Blue Sepharose カラム	84
Copper Chelating Sepharose カラム	86
Copper から Phenyl への移行	86
Phenyl Sepharose カラム	88
全 体	50

## 【 0 1 4 0】

バッチプロセスおよび灌流プロセスを使用して得た精製生産物を比較した場合、灌流プ

ロセスは明確により純度の高い前駆体 r h A S B を生産する。異なる洗浄画分の選択または条件の変更によってバッチプロセスをさらに至適化する試みでさえ、灌流プロセスによって得ることができる純粋な生産物は一貫して得られなかった。灌流プロセスは、99%またはそれ以上の純度の前駆体 r h A S B を一貫して生産することができる一方で、バッチプロセスはできない(表 2 1)。図 6 は、細胞培養物を G 4 1 8 を補足し、且つ葉酸、セリン、およびアスパラギンを補足しない培地を使用して培養する古いバッチ方法を使用して得た生産物(レーン 2)と灌流プロセスを使用して精製した精製生産物(レーン 3 ~ 9)との比較を示す。r h A S B サンプルを還元剤を含む S D S 中で変性させ、4 ~ 20% P A G E を含む S D S ランニング緩衝液による電気泳動に供した。バッチプロセス精製生産物は、灌流プロセス精製生産物よりも明らかに遥かに大量の夾雑物(特に、48 k D a サイズ付近)を含む。バッチプロセスの r h A S B は、検出可能な量のプロセシング形態を含むようである(1 ~ 15%と評価)(レーン 2)。灌流プロセス精製ロットは互いに非常に類似し、バッチプロセス精製 r h A S B 標準よりも複合体が有意に少なく、灌流プロセス物質の純度がより高いことを示す。

【0141】

表 2 3 は、灌流プロセス精製方法を使用して精製した前駆体 r h A S B の純度を示す。

【0142】

【表 2 5】

表 23: 最終産生物の純度

ロット	RP-HPLC による純度 (%メインピーク)
AC60109 UF 番号 4	99.8
AC60109 UF 番号 10	99.6
AC60109 UF 番号 1	99.7
AC60109 UF 番号 18	99.9
AC60109A UF 番号 22	99.7
AC60109A UF 番号 25	99.8
AC60109A UF 番号 27	100
AC60109 BMK 製造	99.8
AC60202 UF 番号 4	ND
AC60202 UF 番号 10	ND
AC60202 UF 番号 18	ND
AC60202 BMK 製造	100
平 均	99.8

ND = 測定せず

【0143】

表 2 4 は、純度を R P - H P L C および S E C - H P L C (プロセシング形態または多量体などの異なる分子量の夾雑物を定量可能である)によって評価した、灌流プロセス精製方法を使用して精製した前駆体 r h A S B ロットの純度を示す。

【0144】

【表 2 6】

表 24: RP-HPLCおよびSEC-HPLCによる純度

ロット	RP-HPLC による純度 (%メインピーク)	SEC-HPLC による純度 (%メインピーク)
AP60109	99.8	99.8
AP60202	100	>99
AP60204	99.7	99.8
AP60206	100	99.8
AP60301	100	99.6
AP60302	100	99.6
AP60303	100	99.5
AP60304	100	ND*
平 均	99.9	99.6

\* 測定せず

## 【 0 1 4 5 】

[ 灌流プロセスにおけるプロテアーゼ除去 ]

180 Lのバッチスケールでは、ロットあたり2つの比較的巨大な24 LのDEAE Sepharose運転が必要である。灌流プロセスにより回収体積が10倍になるが、実際的な大規模精製のために厳しい実際的でないDEAE Sepharoseカラムサイズおよび緩衝液体積が課される。したがって、新規の灌流精製ステップを合理化する目的で、特に支持できないDEAE Sepharose列(train)の排除を評価した。結果として、3つのカラム列(表16に記載)により、この大規模生産における障害が克服される。

## 【 0 1 4 6 】

主に総タンパク質(プロテアーゼが含まれる)およびpH指示薬(フェノールレッド)を除去するために、バッチプロセスにおけるDEAE Sepharoseクロマトグラフィステップ(表15に記載の)を使用した。302培地組成からのフェノールレッドの除去により、新規のプロセスにおける後者の問題に取り組む。DEAE Sepharoseステップによる総タンパク質の除去により、pH5.5でより高いBlue Sepharose能力が得られた。新しいプロセスでは、Blue Sepharose条件はバランスのとれた高r h A S B能力を有する一方でプロテアーゼ活性が限定されることが必要である。能力およびタンパク質分解は共に低pHで増大する。さらに、バッチプロセスにおいてプロテアーゼ(カテプシン)のクリアランスに問題がある場合、プロテアーゼのクリアランスは、その後のCopperクロマトグラフィステップの堅牢性の改良を証明することができるべきである。0.8 mg r h A S B / ml樹脂のロードが許容可能な、低pHでローディングが実施される条件が見出される一方で、洗浄および溶離条件はより高いpH(プロテアーゼ(カテプシン)を有効に除去する条件)である所望の結果が得られる条件が見出された。プロテアーゼ活性(例えば、カテプシン)の除去は、図8のクロマトグラムにおいて証明される。

## 【 0 1 4 7 】

新しいプロセス(DEAE FTクロマトグラフィを使用しない)または古いバッチ精製プロセス(PS溶離物)(OP)のいずれかを使用した灌流運転から精製されたr h A S B(102PD0055)の比較は、銀染色および抗A S B抗体によって検出可能なさらなるバンドによって証明されるように、(バッチ法を使用して)同一のリアクター運転から精製された古いプロセスの材料(レーンPS溶離物(OP))は有用なより高いタンパク質分解性を有することを示す(図9参照のこと)。新しいプロセスは、バッチ標準と比較してさらに高い純度が高い。Blueクロマトグラフィによってカテプシンプロテアーゼを除去する。新規のプロセスを使用したBlue Strip画分中で抗カテプシン交差反応性材料が認め

られる。

【 0 1 4 8 】

以下の実施例 1 1 に記載の薬物動態学の結果は、より純度の高い r h A S B 調製物により以前のバッチ標準よりも半減期が長いことを示す。

〔 実施例 1 0 〕

【 0 1 4 9 】

〔 粒子形成における界面活性剤の効果 〕

新規の灌流細胞培養プロセスを使用して作製した r h A S B バイアルにおける粒子作製に対するポリソルベート 8 0 の効果を決定するために、実験プロトコルを行った。目視アッセイおよび粒子計数アッセイを使用して、粒子作製範囲を決定した。さらに、未処理コントロールと比較したポリソルベート 8 0 の存在下および / または震盪における生産物の質を確認するために、活性試験、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( P A G E )、免疫ブロッティング、およびサイズ排除クロマトグラフィ ( S E C ) を行った。r h A S B バッチプロセスのために使用したバイアルおよびストッパー ( 古い、Wheaton 5ml、2905-B2 4B/West S-127(4401/45) ) も、灌流由来の材料のための使用が推奨されているバイアルおよびストッパー ( 新しい、Wheaton 5ml、2905-B8BA/West S-127(4432/50) ) と比較した。

【 0 1 5 0 】

1 0 m l の使い捨てピペットを使用して r h A S B を 0 . 2  $\mu$  m フィルターに通過させた後にバイアルに充填した。各 r h A S B 汚染試験のために、2 つのバイアルに充填した。両方を目視アッセイに使用し、これは一方を粒子計数に供し、他方を残りのアッセイのために保存した。1 つの緩衝液コントロールバイアル / 試験のみに充填した。準備、サンプル操作、濾過、または充填によって、粒子はほとんど移入しなかった。目視分析および粒子計数分析から ( 以下の表 2 5 A ~ C および 2 6 A ~ C に示した結果 )、0、1、および 1 4 日目に、緩衝液のみのコントロールと比較して配合薬の非震盪バイアルにおいて有意な粒子の形成は検出されなかった。

【 0 1 5 1 】

4 で 1 8 時間の震盪後、ポリソルベートを含まない組成から成る緩衝液 ( 1 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M 塩化ナトリウム ( p H 5 . 8 ) ) のみにおいて r h A S B と共に両バイアル形状で粒子の高い増加が認められた。細かいフレークが明らかに認められた。

【 0 1 5 2 】

HIAC/ROYCO Model 9703 Particle Counter を使用して、粒子を計数した。液体粒子カウンターは、2 . 0  $\mu$  m ~ 1 5 0  $\mu$  m の範囲の粒子のサイズを測定し、計数することができる。それぞれ 5 m L 未満の 3 つのアリコート、光不明瞭化センサー ( light obscuration sensor ) に入れる。運転 2 および 3 由来の平均粒子数を m L あたりの粒子数として報告する。粒子サイズ 1 0  $\mu$  m の HIAC-Royko 定量に基づいて、古いおよび新しいバイアル形状それぞれにおける m L あたりの粒子数が 2 0 6 9 および 1 1 9 0 の粒子を計数した。0 . 0 0 1 % ポリソルベート 8 0 の存在下で、m l あたりの粒子数は 2 1 および 4 9 と顕著に減少した。0 . 0 0 5 % ポリソルベート 8 0 では、震盪および非震盪バイアルの両方で本質的に有意な相違を検出することができなかった。

【 0 1 5 3 】

ポリソルベート 8 0 を使用しない古いバイアル / シールでは、m l あたりの粒子数が震盪 1 ~ 1 4 日後に 2 0 6 9 個から 2 6 8 個に予想外に減少した。ウイルスアッセイにより、より少数が認められた同一の 1 4 日目のバイアルでより巨大なフレークが認められ、より巨大な粒子が H I A C - R o y k o アッセイを妨害するか、古いバイアル形状がより巨大であるが少数の粒子への最終的な合体および凝集を伴う粒子形成の増大に寄与する可能性がある。

【 0 1 5 4 】

震盪後のタンパク質の完全性を確認するためにさらなる試験を行った。比活性は変わらなかった。サイズ排除クロマトグラフィ ( 機械的振動に影響を受け得るタンパク質凝集の

10

20

30

40

50

変化を検出することができる方法)では、より巨大な分子量種の増加は認められなかった。破壊生産物を検出するために、r h A S B の S D S - P A G E ゲルを銀染色するか、ニトロセルロースに移して抗 r h A S B 抗体でブロッティングした。いかなるサンプルにおいてもさらなるバンドは検出されなかった。

【 0 1 5 5 】

【表 2 7】

表 25A: 目視アッセイ(0日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-01		緩衝液
		震盪なし		震盪なし
古い	0	(-)	(-)	(-)
古い	0.005	(-)	(-)	(-)
古い	0.001	(-)	(-)	(-)
新しい	0	(-)	(-)	(-)
新しい	0.005	(-)	(-)	(-)
新しい	0.001	(-)	(-)	(-)

10

【 0 1 5 6 】

【表 2 8】

表 25B: 目視アッセイ(1日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-08				緩衝液	
		震盪		震盪なし		震盪	震盪なし
古い	0	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
古い	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
古い	0.001	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0.001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

30

【 0 1 5 7 】

【表 2 9】

表 25C: 目視アッセイ(14日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-01				緩衝液	
		震盪		震盪なし		震盪	震盪なし
古い	0	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
古い	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
古い	0.001	(+/-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新しい	0.001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

40

#### 目視アッセイ

視覚可能な沈殿はなし

-

境界、認められるかは不正確

-/+

少量の細かい沈殿

+

有意な沈殿(濁り)

++

非常に濁っている(沈殿の巨大なフレーク)

+++

【 0 1 5 8 】

50

## 【表 3 0】

表 26A: 粒子分析、HIAC-Royko(粒子/mL)(0日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-01		緩衝液	
		震盪なし		震盪なし	
		10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m
古い	0	4.5	0.5	2.5	0.0
古い	0.005	2.0	0.5	1.5	0.0
古い	0.001	4.5	1.5	2.5	1.0
新しい	0	6.5	2.5	6.0	4.0
新しい	0.005	1.5	0.5	3.0	1.0
新しい	0.001	19.5	5.0	2.0	0.0

10

## 【 0 1 5 9 】

## 【表 3 1】

表 26B: 粒子分析、HIAC-Royko(粒子/mL)(1日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-01				緩衝液			
		震 盪		震盪なし		震 盪		震盪なし	
		10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m
古い	0	2069.0	74.5	3.0	0.5	0.5	0.5	2.5	2.0
古い	0.005	3.5	0.0	2.0	0.5	3.5	2.5	1.0	0.5
古い	0.001	21.5	2.5	2.0	1.0	2.5	1.0	1.5	1.5
新しい	0	1190.0	34.5	5.0	0.5	0.0	0.5	2.5	3.5
新しい	0.005	19.0	0.0	4.5	0.0	2.5	0.0	17.0	0.0
新しい	0.001	49.0	0.5	9.0	2.5	9.5	0.5	6.0	1.0

20

## 【 0 1 6 0 】

## 【表 3 2】

表 26C: 粒子分析、HIAC-Royko(粒子/mL)(14日目)

バイアル	[ポリソルベート 80] %	102PD0089-01				緩衝液			
		震 盪		震盪なし		震 盪		震盪なし	
		10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m	10 $\mu$ m	25 $\mu$ m
古い	0	268.0	18.0	0.5	0.0	4.5	2.0	0.0	0.5
古い	0.005	2.0	2.5	1.0	1.0	2.5	0.5	6.0	3.0
古い	0.001	72.0	6.5	7.0	3.0	7.0	1.0	1.0	2.0
新しい	0	1335.0	29.0	2.0	0.0	1.5	0.0	1.5	0.5
新しい	0.005	7.0	0.5	16.0	0.0	13.5	0.0	13.0	2.0
新しい	0.001	38.0	1.5	5.5	0.5	16.0	0.5	8.0	0.0

30

40

## 【 0 1 6 1 】

結果は、手作業の充填手順により配合に無関係の粒子はほとんどないことを示した。180rpmで一定且つ激しい震盪後、ポリソルベート80を使用しないで配合したr h A S Bを含むバイアル粒子は明確に認められた。

## 【 0 1 6 2 】

ポリソルベート80の存在は、機械的に誘導された粒子形態の障害に非常に有効であった。0.001%および0.005%のポリソルベート80では、震盪バイアルにおける粒子数は本質的にバックグラウンドレベルに維持されながら、保護は著しかった。0.005%のポリソルベート80濃度により、0.001%のポリソルベート80濃度よりも

50

粒子数の減少においてわずかな改善が認められた。

【0163】

活性、タンパク質濃度、純度、または凝集率によって評価したところ、震盪または処方では決して生産物は不安定にならなかった。

〔実施例11〕

【0164】

[ヒトの臨床試験]

本明細書中に記載のバッチプロセスにしたがって生産された製剤を使用して、V I型ムコ多糖体症(M P S V I)(マロトー・ラミー症候群)患者組換えヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ(r h A S B)の第1 / 2相の無作為な二重盲検臨床試験を行った。9 m Mリン酸二水素ナトリウム・1 H<sub>2</sub>O、1 m M第二リン酸ナトリウム・7 H<sub>2</sub>O、150 m M塩化ナトリウムでr h A S Bを1 m g / m Lの濃度(p H 5 . 8)に配合した。患者に投与する場合、室温で通常の生理食塩水を含む静脈内(I V)バッグ中での適量の薬物溶液の希釈によってr h A S Bを調製した。注入関連反応の可能性を減少させるために、注入前に全患者に抗ヒスタミンを前投薬した。

【0165】

本研究の目的は、M P S V I患者のE R Tとして2つの用量のr h A S Bの安全性、有効性、および薬物動態学プロファイルを評価することであった。患者に二重盲検様式で2つの投与群(0 . 2および1 . 0 m g / k g)の1つに無作為に選択した。4時間のI V注入として、1週間に1回薬物を投与した。安全性の基準は、完全な化学パネル、尿検査、完全血球算定(C B C)の相違、およびA E追跡を含んでいた。全患者について免疫応答および注入関連反応、補体活性化、ならびに抗体形成を評価する。有効性パラメータは、運動耐容能 / 耐久力(6分間歩行試験)、呼吸器の能力(肺機能試験)、関節運動範囲(J R O M)、機能的状態(Childhood Health Assessment Questionnaire(C H A Q))、尿中G A Gレベル、肝腫脹の変化、視力、心機能、および睡眠時無呼吸を含んでいた。

【0166】

注入時および注入後の抗原(酵素)レベルを測定するために、1、2、12、24週間の注入後、およびその後定期的に薬物動態学的評価を行った。患者が、84週間後から開始する0 . 005 %ポリソルベート80を使用して配合した新規の灌流プロセス精製r h A S Bに切り替えた場合、83、84、および96週間後の非盲検期間において薬物動態学的評価を行った。

【0167】

7人全ての患者を登録し、急速に進行するか中程度に進行する疾患と一致する特徴範囲を有する患者を含んでいた。個人的理由により1人の患者は3週目で研究を停止し、交換した。残りの6人の患者について、24週間の処置完了後に事前に指定していた中間分析を行った。24週目の中間分析由来のデータは、r h A S Bが十分に許容され、1 . 0 m g / k gの用量でより高い臨床上の利点を得られ、且つ0 . 2 m g / k gの用量に匹敵する安全プロファイルを有することを示した。

【0168】

低用量群の患者に、1 . 0 m g / k gの用量レベルの処置を継続した。48週間後に間隔をおいて(59週および69週)2人の患者により高い用量レベルの処置を開始した。96週まで患者に計画した大多数のr h A S B注入を行った。この期間中に全部で2回を超えて注入しそなかった患者は存在しなかった。

【0169】

最初に処置から24週後、その後48週後に実施した安全性評価は、0 . 2または1 . 0 m g / k gのr h A S Bでの毎週の処置は十分に許容され、2つの用量群で有意差はないことを示した。より長期(96週)の毎週1 . 0 m g / k gでの処置も十分に許容された。

【0170】



## 〔抗 r h A S B 抗体の生産および補体レベル〕

6 人の全患者は 30 週目に r h A S B に対する抗体を生産した。6 人の患者のうち 4 人は比較的低いレベルのままであり、60 週までにピークレベルから減少した。他の 4 人の患者よりも高レベルで抗体を生産した 2 人の患者のうちの一方の患者の抗体レベルは 24 週でピークレベルから減少、他方の患者のレベルは 60 週でピークレベルから急速に低下した。96 週の処置において C H 5 0、C 3、または C 4 補体レベルの一貫した変化は認められなかった。患者によっては C H 5 0 レベルは断続的に適度に減少したが、補体消費またはこれらの低レベルと注入関連症状との間の相関の証拠は認められなかった。図 10 は、96 週間にわたる処置における抗体レベルを示す。

## 【0171】

## 〔尿中グリコサミノグリカン〕

尿中 G A G レベルは、M P S 罹患個体におけるリソソームの蓄積度の生化学的マーカーである。24 週までに、低用量群で 55 % であるのに対し高用量群で平均 70 % の尿中 G A G が減少した。D S ( M P S V I の主な蓄積産物 ) の比率は、同様にそれぞれ 44 % および 18 % 減少した。処置に対する週の関数としての G A G の尿中排出量の変化の経時変化の試験により、高用量群で 6 週までに総尿中 G A G がより明白に減少した。これらのデータは、より高い用量の方が尿中 G A G および D S の両方の変化が大きいことを確認する。本研究で残った両方の処置群の患者において 96 週まで尿中 G A G は減少し続けた。図 11 は、96 週間にわたる総尿中 G A G レベルの減少を示し、図 12 は、96 週の年相応の正常レベルとの比較を示す。本研究で残った 0.2 mg / kg の用量群の 2 人の患者 (患者 41 および 45) を、69 週および 59 週それぞれでの 1.0 mg / kg の用量に供することに留意のこと。96 週で、スクリーニングにより、これら 2 人の患者の G A G は 85 % および 63 % 減少した。これらは、96 週にわたり 1.0 mg / kg の投与した患者で見出された減少と類似していた。患者 42、43、および 44 は、スクリーニングによりそれぞれ 64 %、77 %、および 86 % 減少した。両群では、より高いベースライン G A G レベルの患者は、正常範囲付近の G A G レベルの患者より減少率が高かった (正常範囲の上限の 5 倍超 (すなわち、平均 + 2 S D))。

## 【0172】

## 〔耐久力〕

耐久力の主な臨床基準を 6 分間歩行試験とした。1.0 mg / kg の研究薬物を投与するために無作為に選択したベースラインで 100 m を超えて歩行できない 2 人の患者 (番号 43 および番号 44) は、24 週までに全歩行距離が非常に改善された。C 1 ~ C 2 頸椎圧迫を発症した番号 44 を除く全患者は、48 週および 96 週までに歩行距離が改善された。図 13 は、96 週にわたる処置による 6 分間歩行試験の結果の改善を示す。

## 【0173】

## 〔有効性のさらなる基準〕

96 週の研究薬物処置の間に多数の他の有効性パラメーターの適度な改善が認められた。肩の R O M (特に屈曲) は、24 週の評価で 6 人の患者のうち 5 人で改善された。96 週で評価した 4 人の患者のうちの 3 人 (番号 41、43、および 45) は、肩の屈曲が増加し続けた。96 週で 4 人の患者のうちの 3 人で、気道機能、強制肺活量 (F V C)、および 1 秒間努力呼気容量 (F E V 1) の測定においてわずかな改善も認められた。登録した 6 人の患者のうち 4 人で測定可能な視力はこれらの 4 人の患者の 3 人において 1 つまたは複数のラインによって改善されたが、1 人の患者はこの期間中に処方レンズを変更した。特にベースラインでより大きな肝臓を有する患者において、C T スキャンによって測定された肝腫脹 (この疾患の顕著な特徴ではない) も適度に減少した。

## 【0174】

残りの有効性パラメーター (E C G による心機能、握力およびピンチ力、C H A Q 質問表、身長および体重、骨ミネラル密度、ならびに睡眠検査が含まれる) でわずかな変化が認められた。96 週間にわたりこれらのいかなるパラメーターにおいても有意な悪化は認められなかった。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 5 】

## [ 薬物動態学 ]

1、2、12、および24週の二重盲検ならびに83、84、および96週の非盲検延長の間に薬物動態学的評価を行った。84週から開始し、患者に実施例9に記載の灌流プロセスによって製造されたrhASBを投与し始めた。

## 【 0 1 7 6 】

0、15、30、60、90、および180分の注入時、240分の注入終了時、ならびに注入から5、10、15、30、45、60、90、120、および240分後に血液サンプルを採取した。非コンパートメント法(non-compartmental method) rhASBの薬物動態学パラメーターを計算した。無限性および最初の瞬間に対する血漿濃度曲線下領域を、定量限度を超える濃度を含む最後の測定点に対して線形台形法を使用して計算した。

## 【 0 1 7 7 】

0.2mg/kg/週投与した患者について、 $AUC_{0-1}$ の平均値は、1週から24週で比較的一貫していた(1週で10,009±5,107、2週で11,232±3,914、12週で13,812±9,230、および24週で13,812±9,230)。1.0mg/kg/週のコホートについて、AUCの平均値は、1週で94,476±13,785、2週で180,909±46,377、12週で157,890±45,386、および24週で251,907±201,747であった。この1.0mg/kg/週群について、 $AUC_{0-1}$ およびAUCの値の増加ならびに大きな標準偏差は、群内の他の2人の患者よりもAUCが約2倍の1人の患者に起因した。

## 【 0 1 7 8 】

0.2mg/kg/週コホートと1.0mg/kg/週コホートとの間の $AUC_{0-1}$ の平均値は、5倍を超える非常に過剰な用量で増加し、rhASBの薬物動態学はこの投与範囲で線形ではないことを示す。

## 【 0 1 7 9 】

以下の表27に83、84、および96週の薬物動態学パラメーターを示す。

## 【 0 1 8 0 】

## 【 表 3 3 】

表 27

パラメーター	83 週	84 週	96 週
Cmax (ng/mL)	1,143±284	1,367±262	1,341±523
Tmax (分)	180	120	121
$AUC_{0-t}$ (分・ng/mL)	172,423±49,495	213,713±45,794	200,116±76,506
$AUC_{\infty}$ (分・ng/mL)	173,570±49,969	215,383±47,018	201,157±77,248
CL (mL/分/kg)	6.23±2.10	4.81±0.99	5.54±2.09
Vz (mL/kg)	67.6±22.0	122±60.2	123±17.4
Vss (mL/kg)	266±52.3	236±21.1	233±27.6
t½ (分)(半減期)	8.49±4.68	19.0±13.2	17.3±8.26
MRT (分)	44.4±7.61	50.9±12.9	46.1±16.1

中央値であるTmax以外は相加平均および標準偏差を報告する。n<3である場合、各患者の値を報告した。

## 【 0 1 8 1 】

83週のパラメーターは、2～24週から得たものに類似し(1人の高AUC患者を除く)、約18ヶ月の毎週の曝露後のrhASBの薬物動態学の一貫性を示す。83週から84週までの平均AUC値は約25%上昇する傾向がある一方で、総体内クリアランスは約25%低下する傾向があった。83週から84週までの半減期は約8.5分間から17～19分間に増加した。96週のパラメーターは、84週のそれに類似していた。この薬

物動態学データは少数の患者に由来するが、各値は実質的に重複しており、これらの結果は、実施例 9 に記載の修正プロセスから得た A S B 調製物の半減期は元の r h A S B 調製物より長いことを示した。

〔実施例 1 2〕

【0 1 8 2】

〔さらなるヒトの臨床研究〕

実施例 9 に記載の新しい灌流プロセスにしたがって生産された製剤を使用して、V I 型ムコ多糖体症 (M P S V I) (マロトー - ラミー症候群) 患者における組換えヒト N - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ (r h A S B) の第 2 相非盲検臨床試験を行った。9 m M リン酸二水素ナトリウム・1 H<sub>2</sub>O、1 m M 第二リン酸ナトリウム・7 H<sub>2</sub>O、1 5 0 m M 塩化ナトリウム、0 . 0 0 5 % ポリソルベート 8 0 で r h A S B を 1 m g / m L の濃度 (p H 5 . 8 ) に配合した。

10

【0 1 8 3】

本研究の目的は、1 . 0 m g / k g の r h A S B の毎週の I V 注入の安全性、有効性、および薬物動態学を評価することであった。本研究のために、比較的均一な耐久力障害患者組が含まれるように対象基準を修正した。患者は少なくとも 1 m 歩行することができなければならないが、ベースラインでの 1 2 分間歩行試験の最初の 6 分間で 2 5 0 m しか歩行できなかった。他の対象基準および除外基準は、患者は少なくとも 5 歳であり、生化学的または遺伝的診断が報告されているという点で、第 1 / 2 相臨床研究の基準と類似していた。歩行試験に加えて、本研究では M P S 患者で前に研究されていない多数の測定点を

20

【0 1 8 4】

安全性の基準は、臨床検査評価、尿検査、C B C の相違、E C G、および A E の追跡を含んでいた。全患者について注入関連反応ならびに補体消費および抗体断片化を評価する。有効性パラメーターは、耐久性および可動性の測定 (1 2 分間歩行試験が含まれる)、長期間立ち上がり前進試験 (Expanded Timed Get Up and Go Test)、3 分間の階段上り試験、および身体活動を含んでいた。主観的効果 (関節の痛みおよび関節の硬さなど) を問診票で評価し、デンバー式発達スケール (Denver Developmental scale) における他の測定 (靴紐を結ぶ時間、頭頂に触れる時間、セーターを着る時間、コインを拾い上げてこれらをカップに入れる時間など) も評価した。さらなる有効性の基準は、視力の測定、骨密度の研究、握力およびピンチ力の評価、肩の R O M、機能の状態、尿中 G A G 排出、目視試験、心機能、ならびに睡眠中の酸素飽和度を含んでいた。注入時および注入後の抗原 (酵素) レベルを測定するために、1、2、1 2、2 4 週間の注入後に薬物動態学的評価を行った。1 0 人の患者を登録した (米国人 5 人およびオーストラリア人 5 人)。全ての患者に 2 4 週の処置を完了させた。死亡者や中断者は存在しなかった。全患者は全 2 4 回の研究薬物注入を受けたので、全患者を安全性および有効性分析に含めた。

30

【0 1 8 5】

第 1 / 2 相研究として、第 2 相研究で登録された M P S V I 患者間で疾患の重症度が広範に異っていた。数人の患者は、疾患の神経学的特徴 (交通性水頭症、頸椎の不安定、および椎間板疾患が含まれる) も有していた。

40

【0 1 8 6】

〔臨床検査評価〕

2 4 週間にわたりこれらの患者で臨床的に有意な検査所見の異常は認められなかった。

【0 1 8 7】

〔抗 r h A S B 抗体および補体研究〕

2 4 週までに 1 0 人の患者のうち 8 人が r h A S B に対する抗体を産生した。他の患者より高いレベルで抗体を産生した 3 人の患者のうち、2 人の患者の抗体レベルが 2 4 週後に上昇し続けたが、4 8 週までに安定化するようであった。これら 2 人の患者は、「ヌル」遺伝子型であるか A S B の推定主要抗原部位が変異していた。他の患者と比較して、これら 2 人の患者の尿中 G A G の減少は低かった。図 1 4 は、4 8 週にわたる処置における

50

抗体レベルを示す。

#### 【 0 1 8 8 】

24週で、1人の患者12週注入前後のC4値およびCH50値が減少し、これは研究者によって臨床的に有意であると見なされた。C4およびCH50は、注入前にわずかに正常値の下限未満であり、注入後にさらに減少した。これらの結果により、補体消費の可能性が示唆されるが、このような消費と一致する臨床的徴候および臨床症状は認められなかった。本研究におけるいかなる他の患者においても臨床的に有意な補体レベルの異常は認められなかった。

#### 【 0 1 8 9 】

##### [ 尿中グリコサミノグリカン ]

尿中GAGレベルの平均減少は急速であり、6週で最下点に達し、6週から24週まで比較的一定なままであった。24週までに尿中GAGは平均71%減少し、48週までに尿中GAGは平均76%減少した。10人全ての患者は、処置24週後に正常範囲に近づく尿中GAGレベルに減少した。これらのデータは、1/2相研究における7人の患者で認められた結果と一致する。図15は、48週間にわたる総尿中GAGレベルの減少を示し、図16は、48週でのレベルと年相応の正常レベルとの比較を示す。

#### 【 0 1 9 0 】

##### [ 耐久性の基準 ]

ベースラインおよびその後6週間毎の全ての患者についての12分間歩行試験において歩行距離を評価した。各評価で2つの異なる基準の平均として距離を記録し、6分間および12分間の両方で決定した。

#### 【 0 1 9 1 】

ベースラインでは、6分間および12分間の平均歩行距離は、それぞれ152.4(±75.0)および264.0(±161.7)であった。24週での6分間の平均歩行距離は57.3(±59.0)メートル改善される一方で(患者あたり62%)、12分間の平均歩行距離は平均155メートル改善された(患者あたり98%)。全ての患者で12分間の歩行距離が改善され、1人を除く全ての患者で歩行の最初の6分間で改善された。48週で、12分間の歩行距離における平均改善は212メートルであった(患者あたり138%)。図17は、48週にわたる12分間の歩行距離の結果の改善を示す。

#### 【 0 1 9 2 】

3分間の階段上りは、耐久力の第2の試験基準であった。ベースラインで、患者は平均50.3(±29.5)段上ることができた。24週までの平均階段上り数は、98.1(±6.25)段に増加し、48段改善し、患者あたり110%(±116%)であった。48週までの平均階段上り数は合計で111段で61段増加し、患者あたり147%の改善であった。図18は、48週間にわたる3分間の階段上り結果の改善を示す。患者は、階段上り数に関して非常にばらつきがあり、ベースラインでのパフォーマンスは24週での改善度と必ずしも関連しなかった。

#### 【 0 1 9 3 】

##### [ さらなる有効性基準 ]

本研究の最初の24週で多数のさらなる有効性パラメーターを評価した。全体的な機能的能力の基準として長期間立ち上がり前進試験を使用した。全体的に、ベースラインと24週との間のこの試験に必要な全時間の有意な減少は認められなかったが、48週で適度に改善した。図19は、48週間にわたる処置における長期間立ち上がり前進試験の結果を示す。

#### 【 0 1 9 4 】

肺機能を評価するために、努力呼気時間(FET)、FVC、およびFEV<sub>1</sub>を行った。以下の表28は、ベースライン、24週、および48週での肺機能値を示し、48週では身長および肝臓肥大症の改善も示す。24週間にわたりこれらのパラメーターの有意な変化は認められなかった。48週では、10人中5人の患者のFVCおよびFEV<sub>1</sub>が改善し、この5人のうちの3人は成長における変化が2%未満にもかかわらず改善を示した

10

20

30

40

50

。48週では、努力呼気時間（1秒超）も平均43%改善した。

【0195】

【表34】

表28:肺機能対成長および臓器肥大症

患者	年齢	ベースライン 身長(cm)	ベースライン (リットル)	FVC	24週の FVC	48週の FVC <sup>1</sup>	身長の変化[cm] (%)	48週の相対 肝臓減少率 <sup>2</sup>	48週の相対 肝臓減少率	48週の相対 脾臓減少率 <sup>3</sup>	48週の相対 脾臓減少率
200	18	96.2	0.47	0.44	0.48	0.48	-0.05(<1)	-6.3	-15.2*	-5.88	-13.90
201	9	93.2	0.52	0.54	0.60	0.60	6.65(7.1)	-2.3	-14.4*	-8.82	-20.17
202	17	120	0.75	ND	0.92	0.92	0.55(<1)	-6.7	-5.3	-27.81	-26.69
203	15	107	0.28	0.27	0.38	0.38	1.9(1.8)	-8.6	-12.5	-16.45	-20.22
204	7	87	0.52	0.60	0.50	0.50	3.8(4.4)	-1.3	-4.5	-6.74	-9.71
300	22	102.4	0.37	0.39	0.37	0.37	2.5(2.4)	-15.5	-20*	-16.58	-21.09
301	9	121.1	1.40	1.46	1.55	1.55	4.9(4.0)	+26.3	+3	19.67	-2.56
302	6	99.7	0.81	0.85	0.83	0.83	4.8(4.8)	+5.7	-13	-1.92	-19.99
303	8	84.6	0.16	0.27	0.31	0.31	1.1(1.3)	-5.8	-13+	-45.33	-49.38
304	16	124.7	0.83	0.74	0.83	0.83	1.3(1.0)	-2.8	-15*	6.93	-6.03

<sup>1</sup> 太字の値は、臨床的に重要な増加を示すFVC値を示す。

<sup>2</sup> ベースライン 681.6±118 cc での平均肝臓サイズ

<sup>3</sup> ベースライン 146.8±40 cc での平均脾臓サイズ

\*ベースラインで体重に対して肝臓体積を95%超を限度として年齢調整し、48週で通常の限度内で調整する。

+ベースラインおよび48週で体重に対して肝臓体積を95%超を限度として年齢調整する。

【0196】

10

20

30

40

表29: 肩の運動範囲

肩の運動	ベースライン	24 週での変化 (機能度)	28 週での変化
全患者 (n=10)	102	6	3
能動的屈曲	116	4	(1)
受動的屈曲	52	5	5
能動的伸展	63	9	(6)
受動的伸展	59	7	6
能動的側方回転	69	9	(6)
受動的側方回転			
90° 未満のベースライン屈曲患者 (n=3)			
能動的屈曲	85	9	5
能動的伸展	50	6	4
能動的側方回転	52	7	7

表 X2

能動的および受動的な肩のROM（屈曲、伸展、回転）を評価した。群全体で、能動的および受動的ROMの両方で増加率が適度に増加したが、患者によっては24週での測定で減少した。48週で、いくつかの外れ値に起因する結果の大きなばらつきが認められるが、特にベースラインでの90°の屈曲未満の患者で認められる肩ROMが改善し続けた。上の表29は、ベースライン、24週、および48週における肩の運動範囲を示す。

#### 【0198】

問診票を使用して痛みおよび硬さを評価した。2人の患者は痛みのスコアが変化しなかったが、7人の患者は24週で痛みの改善が認められた（1人の患者はベースライン評価を行っていなかった）。評価した9人全ての患者において24時間で硬さが改善された。問診票を使用して評価した痛みおよび硬さは、48週まで改善し続けた。48週間にわたる関節の痛みの問診票および関節の硬さの問診票の結果を、それぞれ図20および21に示す。

10

#### 【0199】

患者群全体で有意な握力の改善が認められた。7人の患者は、片手または両手の握力が改善した。24週にわたるピンチ試験では、変化はほとんど認められなかった。48週を除いて他の生活の質の評価で有意な変化はほとんど認められず、器用さおよび感覚（コインの拾い上げによって測定）は適度に改善した。

#### 【0200】

ベルトを取りつけたActiTrac（登録商標）デバイスを使用して活動レベルを評価した。活動レベルの有意な変化は認められなかった。

20

#### 【0201】

心機能評価（ECG）または身長および仰臥位の長さに有意な変化は認められなかった。患者の小集団で行った睡眠検査で臨床的に有意な変化は認められなかった。

#### 【0202】

本発明を現在好ましい実施形態を参照して記載しているが、本発明の精神を逸脱することなく種々の修正形態を実施することができると理解すべきである。したがって、本発明は、特許請求の範囲のみによって制限される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0203】

【図1】本発明のヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ（ASB）の生産方法の流れ図である。

30

【図2】バッチプロセス法によるヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ（ASB）の精製方法の流れ図である（表14）。

【図3】灌流プロセス法によるヒトN - アセチルガラクトサミン - 4 - スルファターゼ（ASB）の精製方法の流れ図である（表14および15）。

【図4】Blue Sepharoseカラム（図4A）、Copper Chelating Sepharoseカラム（図4B）、およびPhenyl Sepharoseカラム（図4C）のクロマトグラムの結果を示す図である。

【図5】灌流プロセス精製方法の銀染色SDS - PAGEの結果を示す4 ~ 20%ポリアクリルアミド勾配ゲルを示す図である（表14および15）。

【図6】以下のサンプルの4 ~ 20%ポリアクリルアミド勾配SDSゲルの結果を示す図である。レーン1、NEBブロードレンジ予備染色分子量スタンダード（分子量をkDaで示す）；レーン2、5 μgのロットAS60001由来のASB（オールドバッチプロセス）；レーン3、5 μgのロットAP60109 UF4由来のASB（灌流プロセス）；レーン4、5 μgのロットAP60109 UF10由来のASB（灌流プロセス）；レーン5、5 μgのロットAP60109 UF15由来のASB（灌流プロセス）；レーン6、5 μgのロットAP60109 AUF18由来のASB（灌流プロセス）；レーン7、5 μgのロットAP60109 AUF22由来のASB（灌流プロセス）；レーン8、5 μgのロットAP60109 AUF25由来のASB（灌流プロセス）；およびレーン9、5 μgのロットAP60109 AUF27由来のASB（灌流プロセス）。ゲルを、クーマシーR - 250で染色するか、銀染色する。

40

【図7】図7Aは、銀染色4 ~ 20%ポリアクリルアミド勾配SDSゲルの結果を示す図

50

である。図 7 B は、クーマシー染色 4 ~ 20 % ポリアクリルアミド勾配 SDS ゲルの結果を示す図である。レーン 1、ロット AP60202 UF4；レーン 2、ロット AP60202 UF10；レーン 3、ロット AP60202 UF18；レーン 4、ロット AP60202 (BMK)；レーン 5、ロット 102PD013 9x B3；レーン 6、ロット 102PD013 9x B5；レーン 7、灌流参照標準 rhASB-202-002；レーン 8、ロット 102PD013 9x P1；レーン 9、ロット 102PD013 9x P2；およびレーン 10、Mark 12 標準（分子量を kDa で示す）。

【図 8】Blue Sepharose カラム（図 8 A）、Copper Chelating Sepharose カラム（図 8 B）、および Phenyl Sepharose カラム（図 8 C）から得たプロファイルを示す図である。図 8 B では、赤色の線でカテプシン活性を示す。

【図 9】図 9 A は、銀染色 4 ~ 20 % ポリアクリルアミド勾配 SDS ゲルの結果を示す図である。図 9 B は、ニトロセルロースに移し、抗 rhASB 抗体で探索した図 9 A のゲルから移したタンパク質の結果を示す。図 9 C は、ニトロセルロースに移し、抗カテプシン抗体で探索した図 9 A のゲルから移したタンパク質の結果を示す。BioLabPreStain は分子量標準を示す（分子量を kDa で示す）。

【図 10】ヒトの第 1 相 / 第 2 相臨床試験における 96 週間にわたる rhASB での処置による血清抗 ASB 抗体レベルを示す図である。

【図 11】ヒトの第 1 相 / 第 2 相臨床試験における 96 週間にわたる rhASB での処置による総尿 GAG レベルの減少を示す図である。

【図 12】rhASB で処置したヒトにおける 96 週目の尿中 GAG レベルと年相応の正常レベルとの比較を示す図である。

【図 13】ヒトの第 1 相 / 第 2 相臨床試験における 96 週間にわたる rhASB での処置による 6 分間の歩行試験の結果の改善を示す図である。

【図 14】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる処置による血清抗 ASB 抗体レベルを示す図である。

【図 15】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる処置による総尿中 GAG レベルの減少を示す図である。

【図 16】rhASB で処置したヒトにおける 48 週目のレベルと年相応の正常レベルとの比較を示す図である。

【図 17】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる 12 分間の歩行試験の結果の改善を示す図である。

【図 18】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる 3 分間の階段上り試験の結果の改善を示す図である。

【図 19】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる処置による長期間立ち上がり前進試験 (Expanded Timed Get Up and Go Test) の結果を示す図である。

【図 20】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる処置による関節の痛みの質問結果を示す図である。

【図 21】ヒトの第 2 相臨床試験における 48 週間にわたる処置による関節の堅さの質問結果を示す図である。

10

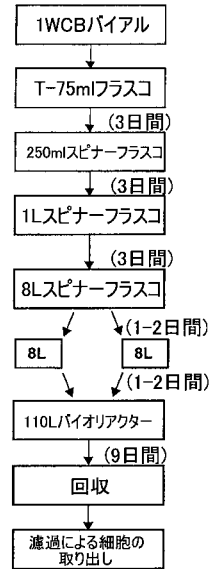
20

30



【図 1】

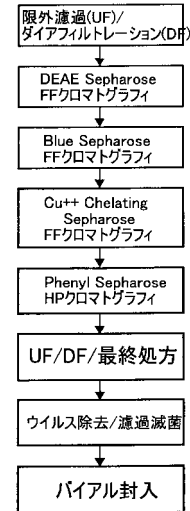
FIG. 1



【図 2】

FIG. 2

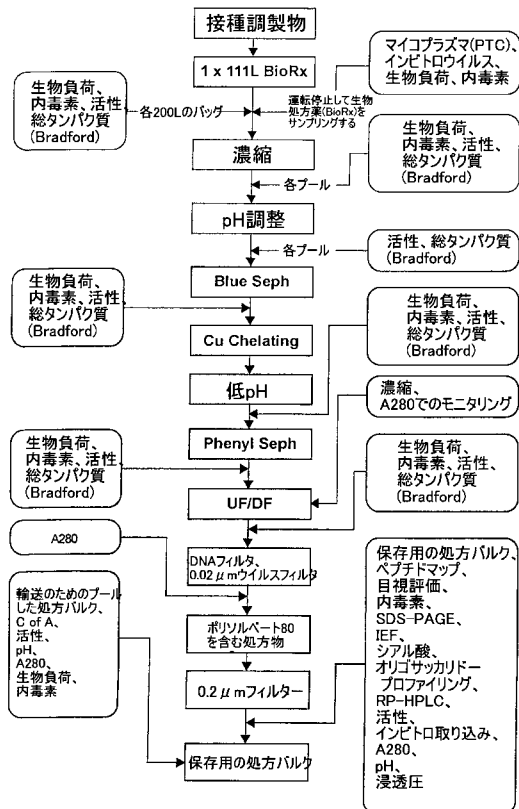
rhASB製剤原料精製プロセスの概要



【図 3】

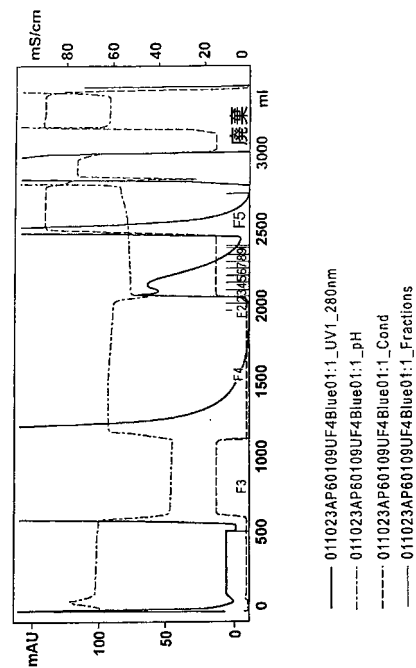
FIG. 3

プロセスの流れ図ーサンプリング

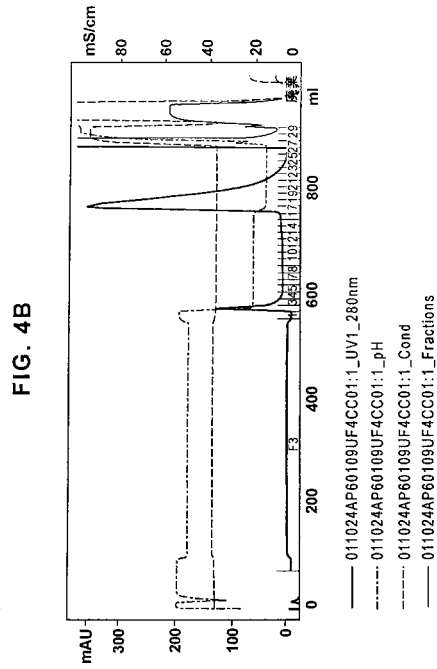


【図 4 A】

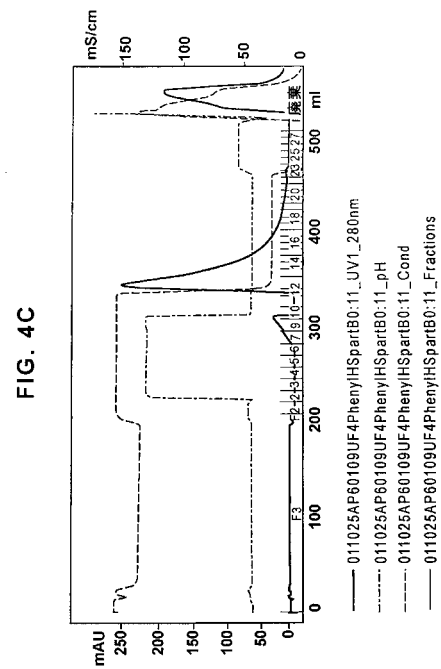
FIG. 4A



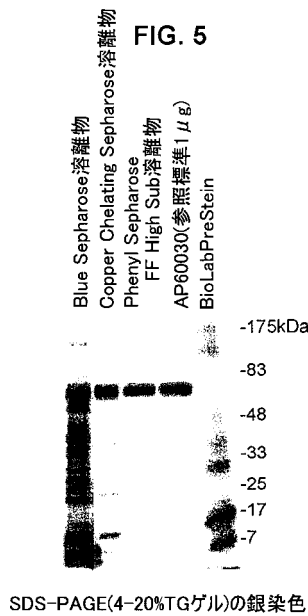
【図 4 B】



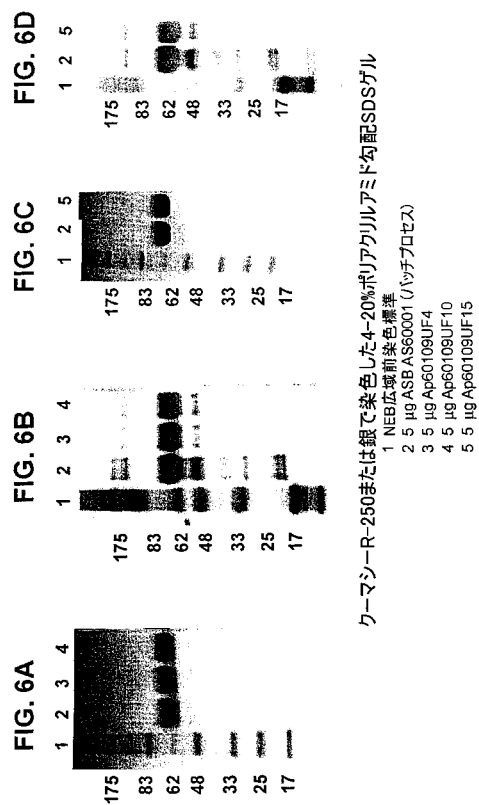
【図 4 C】



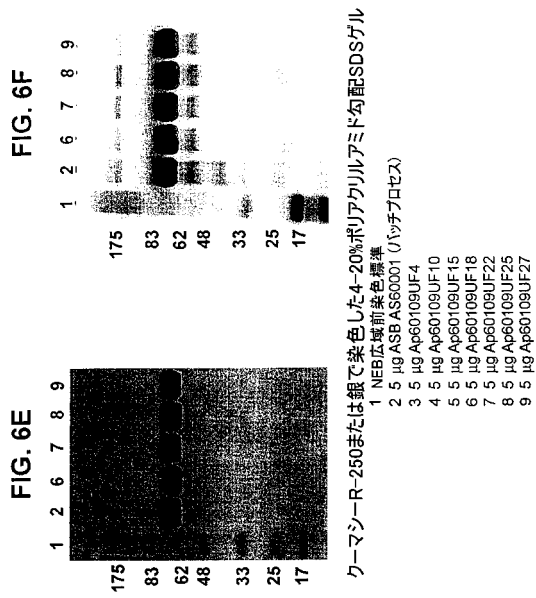
【図 5】



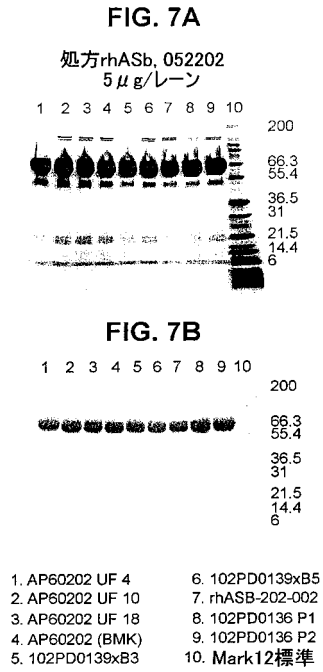
【図 6 A - 6 D】



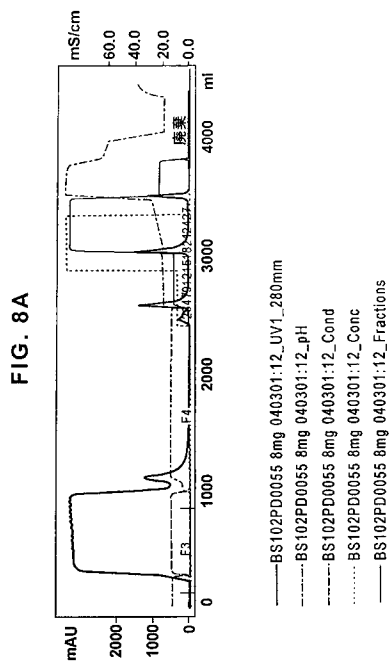
【図 6 E - 6 F】



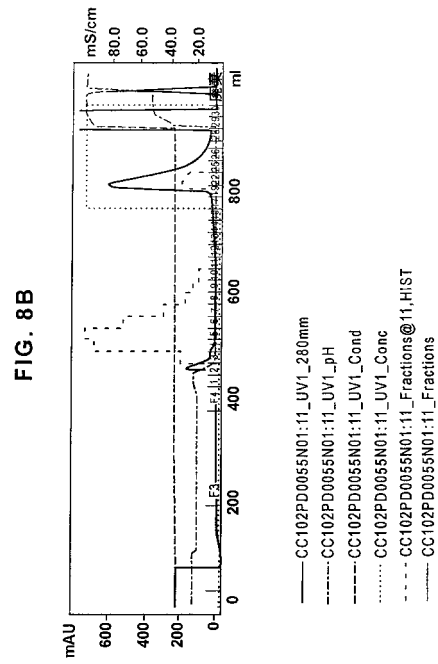
【図 7】



【図 8 A】

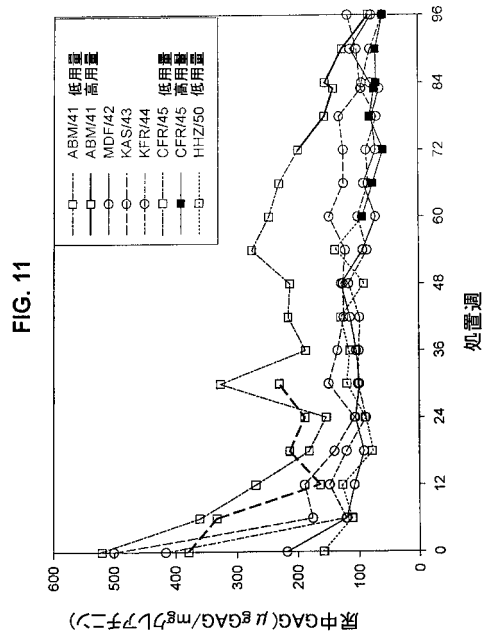


【図 8 B】

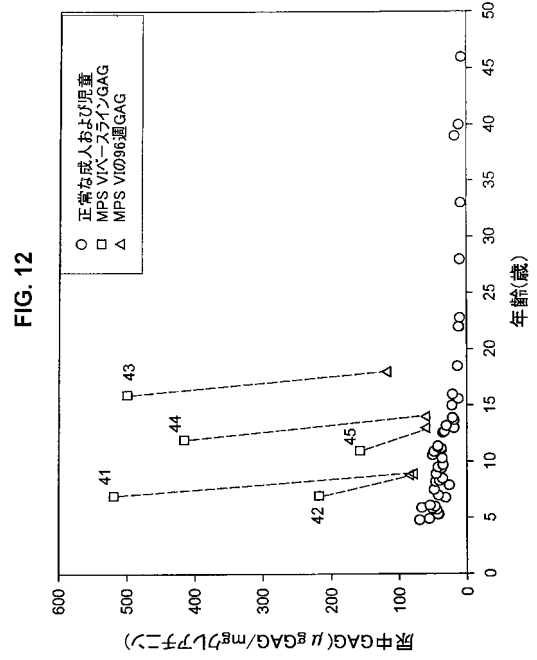




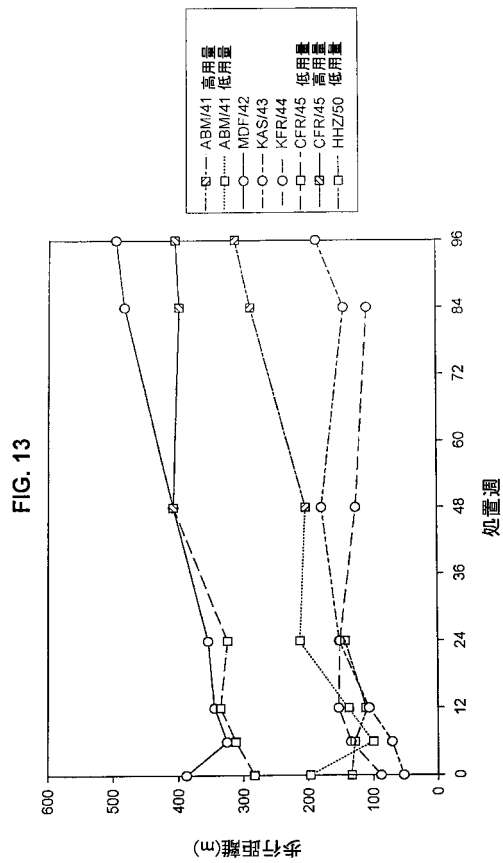
【図 1 1】



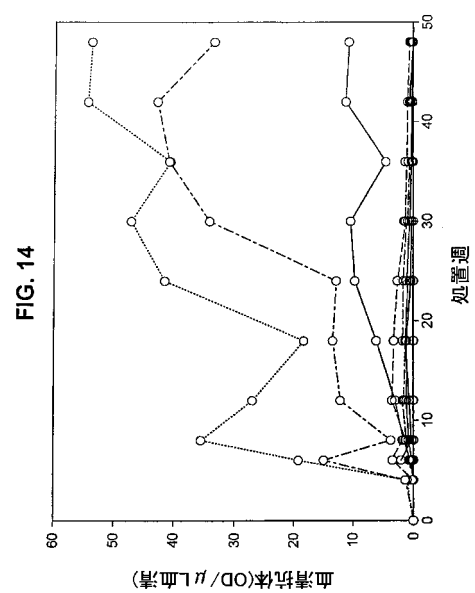
【図 1 2】



【図 1 3】

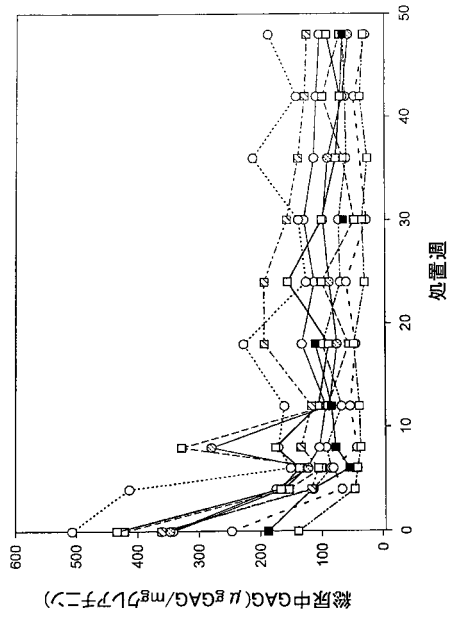


【図 1 4】



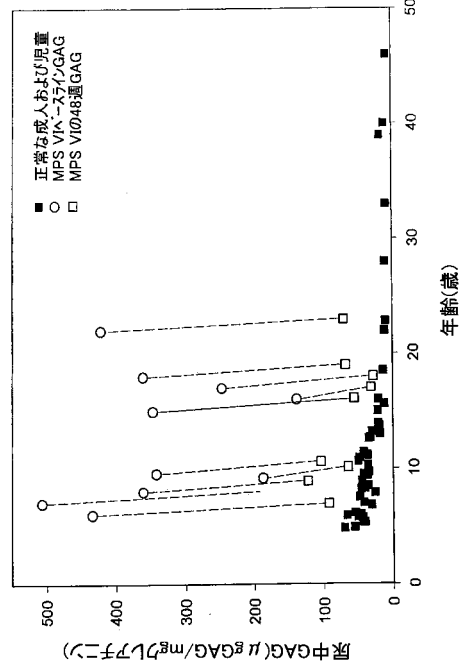
【図 15】

FIG. 15



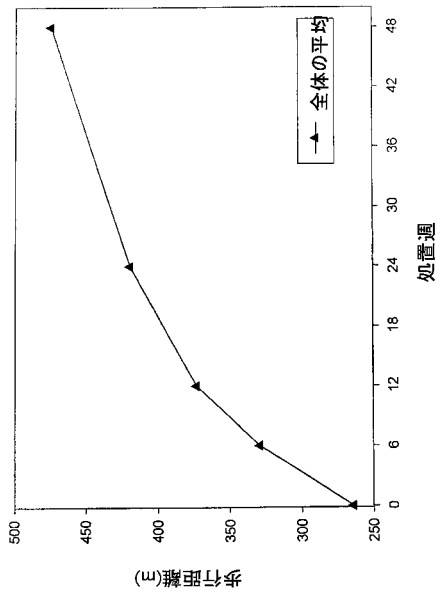
【図 16】

FIG. 16



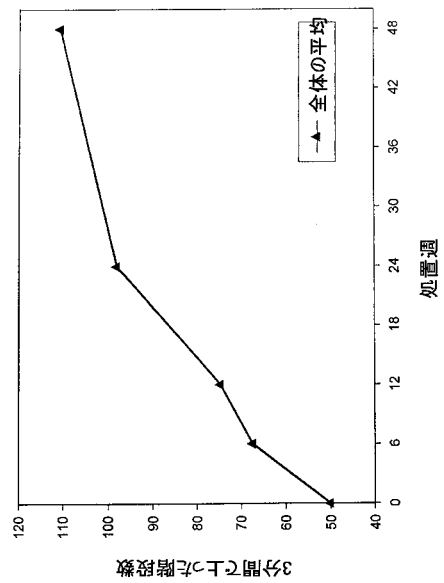
【図 17】

FIG. 17

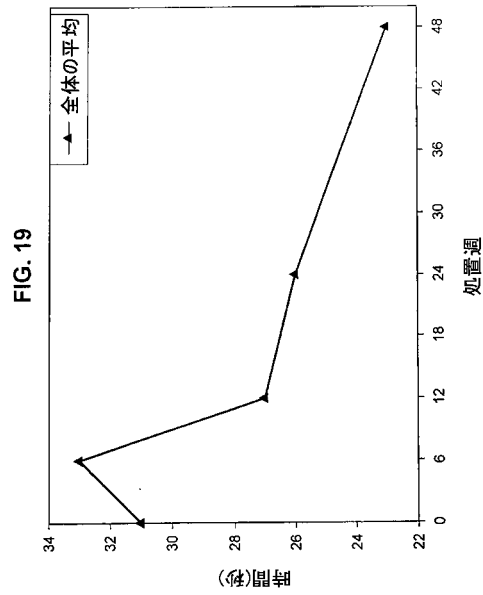


【図 18】

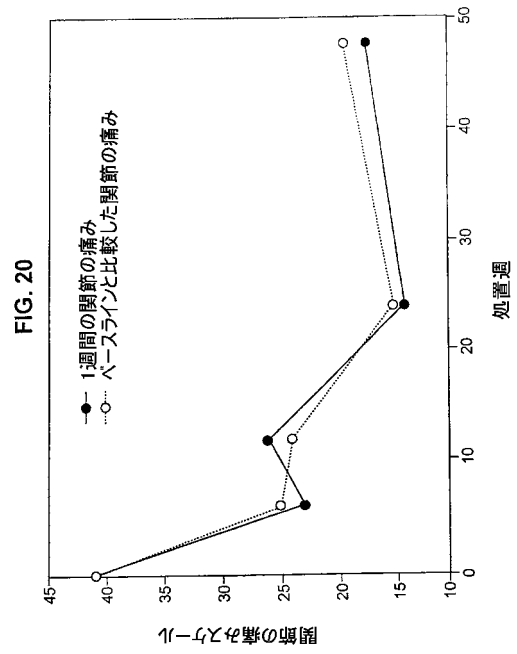
FIG. 18



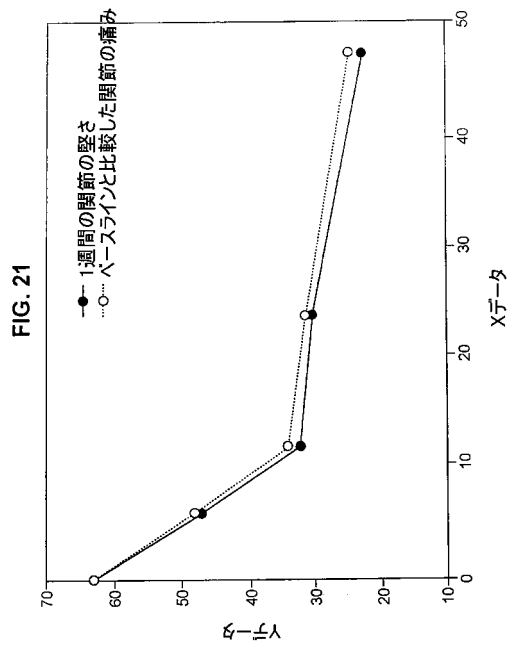
【図 19】



【図 20】



【図 21】



【配列表】

0004459059000001.xml



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 キン, ミンミン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 8 , プレザントン, アレッゾ・ストリート 5 2 8 1
- (72)発明者 ヘンストランド, ジョン・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 6 1 6 , デイヴィス, ティー・プレイス 1 8 0 6
- (72)発明者 ゼカリー, ゲイリー・エヌ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 9 4 5 , ノヴァト, サン・ミゲル・ウェイ 3 9
- (72)発明者 ウェント, ダン・ジェイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 8 , ウォールナット・クリーク, ラ・ヴィスタ・ロード 4 9 6
- (72)発明者 チャン, ウェイ パン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 4 6 , キャストロ・ヴァリー, カリフォルニア・ストリート 1 8 8 4 5
- (72)発明者 チェン, リン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 3 4 , サン・フランシスコ, スウィーニー・ストリート 7 8 3
- (72)発明者 フィッツパトリック, ポール・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 7 0 6 , アルバニー, ピアス・ストリート 5 5 5 , # 2 3 8
- (72)発明者 スター, クリストファー・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 4 7 6 , ソノマ, セヴンス・ストリート・イースト 1 9 5 3 5
- (72)発明者 スウェイドラー, スチュアート  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 6 1 8 , オークランド, オーバーン・アヴェニュー 6 0 1 2

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 特開平 0 4 - 1 4 8 6 7 6 ( J P , A )  
Biochem J., vol.284, p.789-794 (1992)  
J. Biol. Chem., vol.257, p.12605-12610 (1982)  
Genomics, vol.6, p.149-158 (1990)

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 9/16  
A61K 9/08  
A61K 38/43  
A61K 47/08  
A61K 48/00  
A61P 11/00

A61P 19/02

A61P 27/02

A61P 29/00

A61P 43/00

C12N 5/10

C12N 15/09

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

WPI(DIALOG)

BIOSIS(DIALOG)

MEDLINE(STN)