

公告本 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：P2131341

※申請日期：92.11.7

※IPC 分類：A61K38/07
C12N9/16

壹、發明名稱：(中文/英文)

前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，利用該酶之治療方法及製造及純化該酶之方法

PRECURSOR OF N-ACETYLGALACTOSAMINE-4-SULFATASE,
METHODS OF TREATMENT USING SAID ENZYME AND
METHODS FOR PRODUCING AND PURIFYING SAID
ENZYME

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商拜奧馬林製藥公司

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.

代表人：(中文/英文)

克里斯多福 M 史達爾

STARR, CHRISTOPHER M.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州諾維多市貝爾馬林基斯路 371 號 210 室

371 BEL MARIN KEYS BLVD., SUITE 210, NOVATO,
CALIFORNIA 94949, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

參、發明人：（共 9 人）

姓 名：（中文/英文）

1. 金明明

MINMIN QIN

2. 約翰 M. 翰史戴恩

JOHN M. HENSTRAND

3. 蓋瑞 N. 塞克瑞爾

GARY N. ZECHELE

4. 丹 J. 溫德特

DAN J. WENDT

5. 陳華潘

WAI-PAN CHAN

6. 陳琳

LIN CHEN

7. 保羅 A. 費茲派翠克

PAUL A. FITZPATRICK

8. 克里斯多福 M. 史戴爾

CHRISTOPHER M. STARR

9. 史都華 史魏德勒

STUART SWIEDLER

住居所地址：（中文/英文）

1. 美國加州普雷森頓市艾瑞若街 5281 號

5281 ARREZZO STREET, PLEASANTON, CALIFORNIA
94588, U.S.A.

2. 美國加州戴維斯市茶廣場 1806 號

1806 TEA PLACE, DAVIS, CALIFORNIA 95616, U.S.A.

3. 美國加州諾維多市中央路 2187 號

2187 CENTER ROAD, NOVATO, CALIFORNIA 94947, U.S.A.

4. 美國加州華爾納特克里克市拉維艾斯特路 496 號

496 LA VISTA ROAD, WALNUT CREEK, CALIFORNIA
94598, U.S.A.

5. 美國加州加斯洛市加州路 18845 號
18845 CALIFORNIA STREET, CASTRO VALLEY,
CALIFORNIA 94546, U.S.A.
6. 美國加州舊金山市史維妮路 783 號
783 SWEENEY STREET, SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94134, U.S.A.
7. 美國加州艾爾本市皮爾斯街 555 號 238 室
555 PIERCE STREET, #238, ALBANY, CALIFORNIA 94706,
U.S.A.
8. 美國加州索諾馬市第七街東 19555 號
19555 SEVENTH STREET EAST, SONOMA, CA 95476,
U.S.A.
9. 美國加州歐克蘭市奧本大道 6012 號
6012 AUBURN AVENUE, OAKLAND, CALIFORNIA 94618,
U.S.A.

國 籍：（中文/英文）

- | | |
|-------|----------------------------|
| 1. 美國 | U.S.A. |
| 2. 美國 | U.S.A. |
| 3. 美國 | U.S.A. |
| 4. 美國 | U.S.A. |
| 5. 美國 | U.S.A. |
| 6. 中國 | PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA |
| 7. 美國 | U.S.A. |
| 8. 美國 | U.S.A. |
| 9. 美國 | U.S.A. |

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

☒ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 美國；2002 年 11 月 07 日；10/290,908

2.

3.

4.

5.

☒ 主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；2002 年 11 月 07 日；10/290,908

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

本案為美國第 10/290,908 號申請案申請日 2002 年 11 月 7 日之部分連續案，該案全文以引用方式併入此處。

【發明所屬之技術領域】

本發明屬於臨床藥物、生物化學及分子生物學領域。本發明之特徵在於黏多醣病 VI 之治療藥物及治療方法，以及此等治療藥物之製造及純化程序。

【先前技術】

MPS VI(馬洛投-拉米症候群(Maroteaux-Lamy syndrome))屬於一種溶小體儲存病，病人缺乏酶 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)。ASB 酶可代謝糖胺基聚糖(GAG)硫酸皮膚素之硫酸部分(Neufeld 等人，「黏多醣病」，遺傳病之代謝基礎，編輯 Scriver 等人，紐約：麥克羅希爾書報公司，1989 年，1565-1587 頁)。於缺乏此種酶時，硫酸皮膚素之逐步分解受阻，酶基質積聚於寬廣範圍組織之溶小體細胞內部。積聚造成牽涉多重器官及組織之進行性病變，其中嬰兒於初生時外觀正常，但常於青春之前死亡。MPS VI 之診斷通常係在 6-24 個月齡時獲得診斷，此時兒童顯示生長逐漸減慢、肝脾腫大、骨骼畸形、面部輪廓粗糙、上呼吸道阻塞以及關節畸形。MPS VI 兒童也可能出現角質的漸進聚集、連通性水腦或心臟病。死因通常係由於呼吸道感染或心臟病。MPS VI 與 MPS I 不同，MPS VI 並未典型關聯進行性心智狀態受損，但肉體的限制也會影響學習及發展。雖然大部分 MPS VI 病人都有重度疾病形式，通常於青少年期致命，但有些較

非重度形式疾病的病人據描述可存活數十年。

若干公開文獻提供MPS VI發生率估值。1990年英國哥倫比亞大學調查研究1952年至1986年之出生嬰兒，由Lowry等人出版(Lowry等人，人類遺傳學85:389-390 (1990))估計發生率只有1:1,300,000。澳洲的調查研究(Meikle等人，JAMA 281(3):249-54)，1980-1996年出生的嬰兒發現有18名病人，發生率為1:248,000。北愛爾蘭的調查研究(Nelson等人，人類遺傳學101:355-358 (1997))估計發生率為1:840,000。最後，由1970-1996年荷蘭的調查研究算出出生盛行率為每100,000名新生嬰兒0.24(Poorthuis等人，人類遺傳學105:151-156 (1999))。基於此等調查研究，估計美國有50位至300位病人診斷患有各型症候群。

MPS VI並無滿意的治療之道，但少數病人可由骨髓移植(BMT)獲益(Krivit等人，新英格蘭醫藥期刊311(25):1606-11 (1984)；Krivit等人，國際小兒科學7:47-52 (1992))。BMT並非隨處可得，原因在於缺乏適當的骨髓捐贈者，且造成重大罹病率及死亡率。歐洲骨髓移植小組報告63例溶小體病症移植病例之移植相關死亡率由10% (HLA完全相同)至20-25% (HLA不匹配)(Hoogerbrugge等人，刺絡針345:1398-1402 (1995))。除了BMT之外，大部分病人只接受特定問題的症狀治療作為其唯一的醫療照護。本發明之一目的係提供使用重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)之酶補充治療。至今未曾嘗試使用rhASB來治療人類。同樣也未曾提供可接受之臨床劑量或藥物調配物。已經進行若干於貓科MPS VI研究模式之酶補充試驗。

【發明內容】

本發明涵蓋一種包含前驅物形式之高度純化的N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之組成物之製造、純化及使用。前驅物形式之DNA及編碼胺基酸序列分別列舉於SEQ ID NOS:1及2。信號序列預測為SEQ ID NO:2之胺基酸1-38，重組製造結果獲得始於SEQ ID NO:2胺基酸殘基39或40之產物。

於第一方面，本發明之特徵為全部或部分因N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶缺乏造成之疾病之新穎治療方法。一種方法包含對需要此種治療之個體投予有效量之醫藥組合物。較佳具體實施例中，醫藥組合物包含前驅形式之高度純化N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，或其生物活性片段、突變株或類似物單獨或組合一種醫藥適當載劑。該個體患有全部或部分因N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶缺乏引起的疾病。其它具體實施例中，本發明之特徵在於於活體內，移轉編碼全部或部分N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性突變株或類似物之核酸至一或多個宿主細胞內。較佳具體實施例包括對欲治療有機體包括哺乳類或人類之需求最佳化劑量來有效改善疾病症狀。較佳具體實施例中，該疾病為黏多醣病VI(MPS VI)或馬洛投-拉米症候群。

本發明之第一方面特別提供經由投予治療有效量之人類ASB較佳為重組人類ASB，治療患有全部或部分因ASB活性缺乏所引起之疾病之人類之方法。如此本發明涵蓋使用人類ASB製備ASB活性缺乏治療用藥，以及供用於治療ASB活性缺乏之含有人類ASB之醫藥組合物。ASB活性缺乏可觀察

得例如比較正常ASB活性，活性只有50%或以下、25%或以下、或10%或以下，表現為黏多醣病，例如黏多醣病VI (MPS VI)或馬洛投-拉米症候群。治療有效量為足夠對人類病人提供有益功效之量，且較佳對下列任一者提供改善：主觀或客觀關節活動性、疼痛或僵硬；運動忍受性或耐受性，例如藉行走能力或爬高能力來測定；肺功能例如藉FVC、FEV₁或FET測定；視銳度；或日常生活的活動，例如藉由坐著站起來、穿脫衣服或拾取小物件等能力來測定。人類ASB如此處所述較佳係呈高度純化重組製劑投藥。較佳製劑含有藉反相HPLC測定，純度高於95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%之rhASB。較佳製劑也含有高純度前驅形式ASB，故於庫馬希染色SDS-PAGE未偵測得任何加工形式ASB。最佳前驅形式ASB之純度，藉尺寸排除層析術(SEC)-HPLC測定，係大於95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。人類ASB較佳與此處所述之界面活性劑或非離子性清潔劑共同調配，選擇性地排除含0.001%聚氧伸乙基聚山梨糖醇20或80之調配物。

以低於每週1毫克/公斤例如每週0.2毫克/公斤劑量投予rhASB，發現具有有益功效。本發明涵蓋每週至少0.1毫克/公斤、0.2毫克/公斤、0.5毫克/公斤、0.75毫克/公斤、1毫克/公斤、或1.5毫克/公斤之劑量，劑量可高達每週2毫克/公斤、4毫克/公斤、5毫克/公斤或以上之範圍。較佳劑量為1毫克/公斤/週。此種劑量較佳每週輸送一次，但選擇性地也

可以平分劑量以更頻繁次數投藥，例如每週兩次或每日一次。預期涵蓋腸道外或非腸道外投藥途徑，包括口服、經皮、經黏膜、肺內(包括氣霧化)、肌肉、皮下或靜脈投藥其輸送相等劑量。大劑量直接注射或輸注於關節或CSF投藥也特別涵蓋於本發明之範圍，例如鞘內投藥、腦內投藥、腦室內投藥、腰椎穿刺投藥或小腦延髓池投藥。業界已知多種可達成鞘內投藥之手段，包括幫浦、貯器、分流或植入物。較佳劑量係經靜脈輸注持續1、2或4小時時間，最佳為4小時，但也可藉一次大劑量靜脈注射投藥。

預期也涵蓋其它可提高人體ASB活性之手段，包括基因治療，讓病人一過性或永久性增加外生性ASB或內生性ASB的表現。移轉外生性hASB基因或啟動基因其增加內生性hASB的表現透過業界已知之多種手段變成可能，包括病毒載體、同源重組或直接注射DNA。

於第二方面，本發明之特徵在於新穎醫藥組合物，包含一種N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物可用於治療全部或部分因N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)缺乏所引起的疾病。較佳具體實施例中，N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)為前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。此種組合物適合以多種方式投藥，例如腸道外、局部、鼻內、吸入或口服投藥。於此方面之範圍包含具體實施例，其特徵為編碼全部或部分N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之核酸序列可於活體內投予患有N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)缺乏之細胞。

於第三方面，本發明之特徵在於一種製造N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物之方法，其製造量讓該酶可供治療使用。於一廣義具體實施例中，該方法包含下述步驟，將編碼全部或部分N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性突變株或類似物之cDNA轉移感染適合表現用之細胞。較佳具體實施例中，細胞係於恆定或連續培養生長或於灌流生長。另一具體實施例中，細胞係於缺G418之培養基生長。若干具體實施例中，使用編碼完整N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之cDNA，較佳為人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)。但其它具體實施例中，可使用編碼其生物活性片段或突變株之cDNA。特別可做出一或多種胺基酸取代，同時仍然保有或提升酶之生物活性。其它較佳具體實施例中，表現載體用來將cDNA移轉入適合其表現用之細胞或細胞系。一特佳具體實施例中，cDNA被轉移感染入中國倉鼠卵巢(CHO)細胞例如CHO-K1細胞系。又有其它較佳具體實施例中，該製造程序包含下列步驟：(a)於適當生長培養基，生長被轉移感染有編碼全部人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶或其生物活性片段或突變株之DNA之細胞至適當密度；(b)將該經轉移感染細胞導入生物反應器內；(c)供給適當生長培養基至該生物反應器；以及(d)由含酶之培養基分離經過轉移感染之細胞。

於第四方面，本發明提供一種經轉移感染之細胞系，其特徵在於可以可供治療性使用該酶之數量製造N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)。較佳具體實施例中，N-乙醯半乳糖

胺-4-硫酸酯酶為前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。較佳具體實施例中，本發明之特徵在於一種重組CHO細胞系(例如CHO K1細胞系)，其可穩定可靠地製造定量N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物，因而可供治療性使用該酶。特佳為定名為CSL4S-342之轉移基因CHO-K1細胞系。若干較佳具體實施例中，轉移基因細胞系含有一或多套表現組成體。較佳轉移基因細胞系含有約10套或10套以上表現組成體。又更佳具體實施例中，該細胞系可以至少每日每 10^7 細胞約20-40微克之數量表現重組N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物。

於第五方面，本發明提供新穎載體，其適合以可讓該酶供治療用之數量製造N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物。

於第六方面，本發明提供新穎根據本發明方法製造之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物，藉此以可供治療性使用該酶之數量提供該酶。根據本發明之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之比活性較佳係於20-90單位之範圍，且更佳大於約50單位/毫克蛋白質。較佳具體實施例中，N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶為經高度純化之前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。

於第七方面，本發明之特徵為一種純化N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物之新穎方法。根據第一具體實施例，經過轉移感染之細胞物質

經生長且去除而留下重組酶。外生性材料通常係由粗產物本體分離來避免管柱的穢垢。較佳含重組酶之生長培養基通過超濾步驟。另一較佳具體實施例中，純化前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之方法包含：(a)獲得一種流體含有前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；(b)降低該流體中可裂解前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之蛋白酶之蛋白質分解活性，其中該項降低並未損害該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；(c)該流體接觸喜布康藍(Cibracon blue)染料交互作用層析術樹脂；(d)該流體接觸銅螯合層析術樹脂；(e)該流體接觸苯基疏水交互作用層析術樹脂；(f)回收該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。較佳可循序進行步驟(c)、(d)及(e)。熟諳技藝人士了解可刪除或取代一或多個層析步驟，或於本發明之範圍內，層析步驟順序可改變。其它較佳具體實施例中，來自終層析管柱之洗提劑經過超濾/滲濾，進行適當步驟來去除任何甚於病毒。最後，可視需要進行適當消毒步驟。

【實施方式】

本發明涵蓋包含前驅物形式之經高度純化之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之組合物之製造、純化及使用。呈前驅物形式之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之純度藉反相HPLC方法測定至少等於或大於95、96、97或98%總蛋白質。較佳純度至少等於或大於99%。更佳純度至少等於或大於99.1、99.2、99.3或99.4%。又更佳純度至少等於或大於99.5、99.6、99.7或99.8%。又更佳純度至少等於或大於99.9%。前驅物N-乙醯半

乳糖胺-4-硫酸酯酶之純度係使用反相 HPLC 方法測定(參考實施例 9)。前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之純度為組合物大致不含任何污染細胞蛋白質、或經過分解或成熟或經過加工之 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶等可藉反相 HPLC 方法偵測得之污染物含量。全部純度百分比係以藉反相 HPLC 方法測得之總蛋白質為基準。一致可重複之高純度係使用此處揭示之純化方法獲得，因此可使用高純度 rhASB 製劑以每次處理投藥例如每週投藥方式治療需要長期慢性治療的病人。如此本發明預期涵蓋長時間例如 12 週、24 週、48 週、96 週或 96 週以上投予此種高純度之前驅物 rhASB。

於第一方面，本發明之特徵在於全部或部分因 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (ASB) 缺乏引起之疾病之新穎治療方法。一具體實施例中，此種方法之特徵在於單獨或組合醫藥上適當載劑，投予重組 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (ASB) 或其生物活性片段、突變株或類似物。其它具體實施例中，本方法之特徵在於於活體試驗，移轉編碼全部或部分 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (ASB) 或其生物活性突變株之核酸至一或多個宿主細胞。較佳具體實施例包括對需要處理的有機體較佳為哺乳類或人類最佳化需用劑量，俾有效改善疾病症狀。較佳具體實施例中，該疾病為黏多醣病 VI (MPS VI) 亦即馬洛投-拉米症候群。

前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之純度為組合物大致不含任何污染細胞蛋白質，其可能造成被投予前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶個體之免疫反應或過敏反應。若組

合物投予個體時，不會引發任何免疫反應或過敏反應，則該組合物大致不含此種污染宿主細胞蛋白質。高純度前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶對於避免個體因醫藥組合物所存在的雜質發生免疫反應或過敏反應相當重要。此點對於純化獲得前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之該細胞蛋白質特別為真。當重組前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶係由中國倉鼠卵巢細胞表現之純化時，中國倉鼠卵巢蛋白質可能引發個體的免疫反應或過敏反應(例如蕁麻疹)。唯一避免此類反應的手段係確保前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶夠純，因此污染的中國倉鼠卵巢蛋白質數量不足以造成此種反應。醫藥組合物之純度對患有MPS VI病人等個體特別重要，該種個體之免疫功能受損。

此外，前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之純度較佳為組合物僅含微量經加工形式或分解形式。存在於宿主細胞之蛋白酶將N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶裂解成為較低分子量形式。雖然部分形式也可能具有酶活性，但前驅物形式對細胞的吸收以及溶小體的鎖定目標為較佳，如此最終製劑含較高量未經加工的前驅物ASB為較佳。此外，藥品中之分解形式ASB也會造成對ASB本身之抗體發生率增高或抗體數量增高，此點對於需要長期治療的病人特別不利。此處所述灌流純化法，結果獲得的高度純質製劑，其藉SDS-PAGE、RPHPLC及SEC-HPLC檢定分析測得大致上不含污染宿主細胞蛋白質或ASB之加工形式/聚集形式。投予人體時，此種方法製備之產物顯然有較長的半生期。

重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)適用於治療MPS VI，也稱作為馬洛投-拉米症候群。根據較佳具體實施例，初劑量1毫克/公斤(約50單位/公斤)投予患有N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶缺乏病人。較佳N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶係每週注射投藥。根據其它較佳具體實施例，未顯示尿中糖胺基聚糖排泄量減低至少50%的病人，於約使用3個月初劑量之後改變成2毫克/公斤(約100單位/公斤)劑量。較佳N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)或其生物活性片段突變株或類似物係以每週一次靜脈投藥經歷約4小時時間，較佳維持長達疾病之顯著症狀持續時間。此外也較佳N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)係藉置於腦靜脈或其它適當靜脈之靜脈導管與食鹽水的輸注一起投藥，最初始於約30 cc/小時。此外較佳N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)係稀釋入約250 cc生理食鹽水。

於第二方面，本發明之特徵在於新穎醫藥組合物，包含人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)或其生物活性片段、突變株或類似物，其可用於治療N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之缺乏。重組酶除了前文說明之較佳具體實施例外，可以多種方式投藥，例如腸道外、局部、鼻內、吸入或經口投藥。本發明之另一方面係提供經由將酶與醫藥上可接受之載劑共同調配而投予酶，該載劑可為固體、半固體或液體或可食用膠囊。醫藥組合物例如包括錠劑、滴劑例如鼻用滴劑、局部投藥組合物例如軟膏劑、凝膠劑、乳膏劑及懸浮液劑、吸入用噴霧劑、鼻噴霧劑、微脂粒劑。通常

重組酶係佔組合物之 0.05 至 99% 或 0.5 至 99% 重量比，例如注射用組合物為 0.5 至 20%，可服用組合物為 0.1 至 50%。

為了製造含治療用酶之口服單位劑型之醫藥組合物，酶混合固體粉狀載劑例如乳糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、澱粉如馬鈴薯澱粉、玉米澱粉、支鏈澱粉、昆布澱粉粉末或柑橘果肉粉末、纖維素衍生物或明膠；也可包括潤滑劑例如硬脂酸鎂或硬脂酸鈣或卡波蠟 (Carbowax) 或其它聚乙二醇蠟，且壓縮形成錠劑或糖衣錠核。若需要糖衣錠時，該錠核可例如使用濃縮糖液包衣，濃縮糖液含有阿拉伯膠、滑石及/或二氧化碳；或另外使用薄膜生成劑溶解於易揮發之有機溶劑或有機溶劑混合物包衣。可添加染料至此等包衣例如用來區別不同的活性成分含量。至於軟明膠膠囊劑組合物，膠囊係由明膠以及例如甘油作為增塑劑組成或類似之密封膠囊，活性物質可混合卡波蠟或適當油例如芝麻油、橄欖油或花生油。硬明膠膠囊劑可含有活性物質與固體粉狀載劑之顆粒，該等載劑例如為乳糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、澱粉如馬鈴薯澱粉、玉米澱粉或支鏈澱粉、纖維素衍生物或明膠，也包括硬脂酸鎂或硬脂酸作為潤滑劑。

本發明之治療性酶也可經腸道外投藥，例如藉皮下、肌肉或靜脈注射藉單次注射或幫浦輸注或藉持續釋放之皮下植入物投藥，治療性酶可藉吸入投藥。於皮下、肌肉及靜脈注射，治療性酶(活性成分)可溶解或分散於液體載劑媒劑。供腸道外投藥，活性物質可適當混合可接受之媒劑，

媒劑較佳為植物油如花生油、棉籽油等。其它腸道外媒劑例如使用索吉托(solketal)、甘油、甲醛及水性腸道外調配物之有機組合物也可使用。

供腸道外注射投藥，組合物包含根據本發明之活性酸之水溶性醫藥上可接受之鹽溶液，較佳為0.5-10%濃度，選擇性也包含安定劑及/或緩衝物質於水溶液。溶液之單位劑量較佳係包封於安瓿。

當治療性酶係以皮下植入物形式投予時，化合物懸浮或溶解於業界人士已知之緩慢分散材料，或以一種裝置投予，該裝置經由使用恆定驅動力例如滲透壓幫浦而緩慢釋放活性物質。此種情況下可達成長時間投藥。

供局部投藥用，醫藥組合物適合呈軟膏劑、單位劑、懸浮液劑、乳膏劑等劑型。活性物質用量各異，例如為0.05-20%重量比活性物質。局部用醫藥組合物可藉已知方式製備，經由混合活性物質與已知載劑例如異丙醇、甘油、石蠟、硬脂醇、聚乙二醇等。醫藥上可接受性載劑也包括已知之化學吸收促進劑。吸收促進劑例如為二甲基乙醯胺(美國專利第3,472,931號)、三氯乙醇或三氟乙醇(美國專利第3,891,757號)、某些醇類及其混合物(英國專利第1,001,949號)。未破損皮膚局部施用之載劑材料也述於英國專利說明書第1,464,975號，其揭示一種載劑材料，其係由包含40-70% (v/v)異丙醇及0-60% (v/v)甘油，差額(若有)為不超過溶劑總容積40%之稀釋劑惰性成分組成。

含治療性酶之醫藥組合物之投藥劑量可於寬廣範圍改變

，投藥劑量將依據多項因素例如疾病嚴重程度、病人年齡等改變且可個別調整。每日投予之治療性酶用量之可能範圍，值得一提者由0.1毫克至約2000毫克或約1毫克至約2000毫克。

含治療性酶之醫藥組合物適合調配成可以單一劑量單位或多個劑量單位提供於此等範圍之劑量。除了含有治療性酶之外，調配物可含有一或多種藉組合物之治療性酶催化反應之酶基質或輔因子。含治療性酶之組合物也可含有多於一種治療性酶。同理，治療性酶可以軛合形式結合至另一部份例如PEG。此外，治療性酶可含有一或多個鎖定目標部分或一過性胜肽來輔助輸送至感興趣之組織、器官或小器官。

本方法及組合物使用之重組酶也可利用以編碼N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶或其生物活性片段、突變株或類似物之核酸轉形病人細胞而投藥。如此編碼之核酸序列可結合於載體，供轉形入欲治療的病人細胞。此種載體之較佳具體實施例說明於此處。載體可設計成整合於個體之染色體，例如反錄病毒載體；或設計成於宿主細胞自發複製。含有編碼N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶核苷酸序列之載體可設計成可提供酶之連續或經過調節之表現。此外，編碼酶之基因載體可設計成可穩定整合入細胞基因體或只有一過性存在。習知基因治療之概略方法可應用於編碼N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之多核苷酸序列。習知基因治療技術之綜論可參考Friedman，科學 244:1275-1281 (1989)；Ledley, J. Inherit.

Aletab. Dis. 13:587-616 (1990)；及 Tososhev 等人，生物技術之流行觀點 1:55-61 (1990)。

投予重組酶之特佳方法為靜脈投予。特佳組合物包含重組 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝液來維持 pH 於約 5-7 以及人類白蛋白。組合物可額外包括聚氧伸乙基聚山梨糖醇例如波利索貝 (polysorbate) 20 或 80 (吞恩 (Tween)-20 或吞恩-80) 俾改良安定性及延長儲存壽命。另外，組合物可包括業界已知之任一種界面活性劑或非離子清潔劑，包括(但非限制性)聚氧伸乙基聚山梨糖醇 40 或 60；聚氧伸乙基脂肪酸酯類；聚氧伸乙基聚山梨糖醇一異硬脂酸酯類；波洛沙瑪 (poloxamers) 例如波洛沙瑪 188 或波洛沙瑪 407；歐拓希諾 (octoxynol)-9 或歐拓希諾 40。

較佳界面活性劑或非離子清潔劑之存在濃度至少為 0.0001%，或至少 0.0005% 或至少 0.001%、0.002%、0.003%、0.004% 或 0.005% (w/v)。較佳濃度為達成預定安定性所需的最低濃度，但可高達 0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01% 或 0.02% (w/v)。最佳組合物包含波利索貝濃度為 0.005%±0.003% (例如 0.002% 至 0.008%)。此等組合物成分較佳係以下列數量提供：

N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯	1-5 毫克/毫升或 50-250 單位/毫升
氯化鈉溶液	150 mM 於 IV 袋，50-250 cc 總容積
磷酸鹽緩衝液	10-100 mM，pH 5.8，較佳 10 mM

人類白蛋白，選擇性使用 1毫克/毫升

吞恩-20或吞恩-80 0.001%-0.005% (w/v)

較佳具體實施例中，ASB被調配成1毫克/毫升於150 mM NaCl，10 mM NaPO₄，pH 5.8，0.005%波利索貝80。

於第三方面，本發明之特徵在於一種製造N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物之方法而其製造量可讓該酶供治療性使用。於廣義具體實施例中，該方法包含下述步驟，轉移感染編碼全部或部分N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性突變株或類似物之cDNA至適合表現之細胞之步驟。若干具體實施例中，使用編碼完整N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)且較佳為人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之cDNA。但其它具體實施例中，可使用編碼其生物活性片段或突變株之cDNA。特別可進行一或多個胺基酸取代，而仍然保有或提升該酶之生物活性。

其它較佳具體實施例中，表現載體用來將cDNA轉形入供其表現用之適當細胞或細胞系。一特佳具體實施例中，cDNA被轉移感染入中國倉鼠卵巢細胞，例如CHO-K1細胞系。又其它較佳具體實施例中，製造程序包含下列步驟：(a)於適當生長培養基，生長被轉移感染有編碼全部人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶或其生物活性片段或突變株之DNA之細胞至適當密度；(b)將該經轉移感染細胞導入生物反應器內；(c)供給適當生長培養基至該生物反應器；(d)收穫含重組酶之培養基；以及(e)由收穫之培養基實質上去除被轉

移感染卡鈣鉀形密之

生長轉移感染細胞之適當培養基為 JRH Excell 302 培養基，補充 L-麩胺、葡萄糖及次黃嘌呤/胸腺苷，選擇性含或未含 G418。較佳培養基中，JRH Excell 302 培養基額外補充葉酸、絲胺酸及天冬醯胺，培養基不含 G418。使用此種較佳培養基來培養細胞，比使用補充 G418 但未補充葉酸、絲胺酸及天冬醯胺(參考圖 6 第 2 線道)之培養基，可獲得更高純度及前驅物 rhASB。較佳於此種培養基內生長細胞而達成細胞密度約 1×10^7 細胞/毫升，獲得 10-40 毫克/毫升活性酶。此外較佳於生物反應器生長轉移感染之細胞經約 5 至 15 日。更佳約 9 日。較佳轉移感染細胞係使用以灌流為主之方法於生物反應器生長，伴以收集連續長達 35 日。更佳，轉移感染細胞係使用以灌流為主之方法於生物反應器生長，伴以收集連續長達 45 日。又更佳轉移感染細胞係使用以灌流為主之方法於生物反應器生長，伴以收集連續長達 60 日。又遠更佳轉移感染細胞係使用以灌流為主之方法於生物反應器生長，伴以收集連續長達 90 日。

根據較佳具體實施例，轉移感染細胞可經由連續膜例如 10 微米膜、接著 1 微米膜、接著 0.2 微米膜過濾而由生物反應器上清液中實質去除。任何剩餘之收穫培養基可於過濾前拋棄。

重組人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶可於中國倉鼠卵巢細胞製造(Peters 等人，生物化學期刊 265:3374-3381)。其犧牲係藉由於大部分細胞(即使並非全部細胞)表現的高度親和

力甘露糖-6-磷酸受體媒介(Neufeld等人,「黏多醣病」,遺傳病之代謝基礎,編者Seriver等人,紐約:麥克羅希爾書報公司(1989年)1565-1587頁)。一旦結合至甘露糖-6-磷酸受體,則酶經由塗覆的坑洞被胞飲作用攝入,且被轉運至溶小體。於溶小體之pH,酶具有活性,開始由堆積之硫酸皮膚素去除硫酸殘基。於MPS VI纖維母細胞,儲存的廓清率快速,容易於暴露於酶之92小時內獲得證實(Anson等人,臨床研究期刊99:651-662(1997))。重組酶可根據圖1摘述之流程圖方法,以110升(約90升工作容積)之發酵規模製造。

重組酶可使用表1A-C列舉之下列方法製造。

表1A:藉批次饋料法之細胞培養方法

步驟	方法	方法中試驗
1. 解凍工作細胞存庫(WCB)	- 解凍後細胞接種於T-75燒瓶內,連同25毫升JRH Exell 302培養基,培養基補充4 mM L-麩胺,4.5克/升葡萄糖及10毫克/升次黃嘌呤/胸腺苷;進一步補充葉酸、絲胺酸及天冬醯胺(不含G418) - 培養3日而達到1×10^{10}細胞密度	- 細胞數目 - 細胞存活性
	↓	
3. 250毫升離心瓶	- 添加細胞至175毫升經過補充之培養基(不含G418) - 培養3日	- 細胞數目 - 細胞存活性
	↓	
4. 1升離心瓶	- 添加細胞至800毫升經補充之培養基(不含G418) - 培養1-2日	- 細胞數目 - 細胞存活性
	↓	
5. 8升離心瓶	添加細胞至4升經補充之培養基(不含G418)	- 細胞數目 - 細胞存活性

	• 培養1-2日	
	↓	
6. 2x8升離心瓶	• 將工作容積平分至兩個8升離心瓶內 • 添加細胞至各個8升離心瓶內的5.5升經補充之培養基(不含G418) • 培養1-2日	• 細胞數目 • 細胞存活性
	↓	
7. 接種110升生物反應器	• 添加細胞至7毫升經補充之培養基 • 培養9日	• 細胞數目 • 細胞存活性
	↓	
8. 製造	• 於生物反應器內約生長9日	• 細胞數目 • 細胞存活性 • 活性
	↓	
9. 收穫上清液	• 收穫物泵送至100升袋內，冷凍隔夜	
	↓	
10. 去除細胞	• 經10微米膜卡匣、接著為1微米及0.2微米膜卡匣過濾，而由收穫培養基去除細胞。因細胞已經沈降隔夜，故於過濾前最末5%至10%收穫培養基被拋棄。	- QC解除點 • 活性 • 生物負擔 • 內毒素 • 黴漿菌 • 試管內偶發因子

一具體實施例中，經過轉移感染之細胞於細胞培養過程生長，該方法為以灌流為主之方法，伴以收集長達35日或35日以上，收集速率為每日由110升生物反應器收集約400升。較佳收集速率為每日由110升生物反應器收集約800升。處理流程圖比較灌流細胞培養法與批次細胞培養法，顯示

於表 1B。與批次饋料法之比較，以及以灌流為主之細胞培養法之特定變化摘述於表 1C。

表 1B：批次饋料法與灌流法間之細胞培養方法之比較

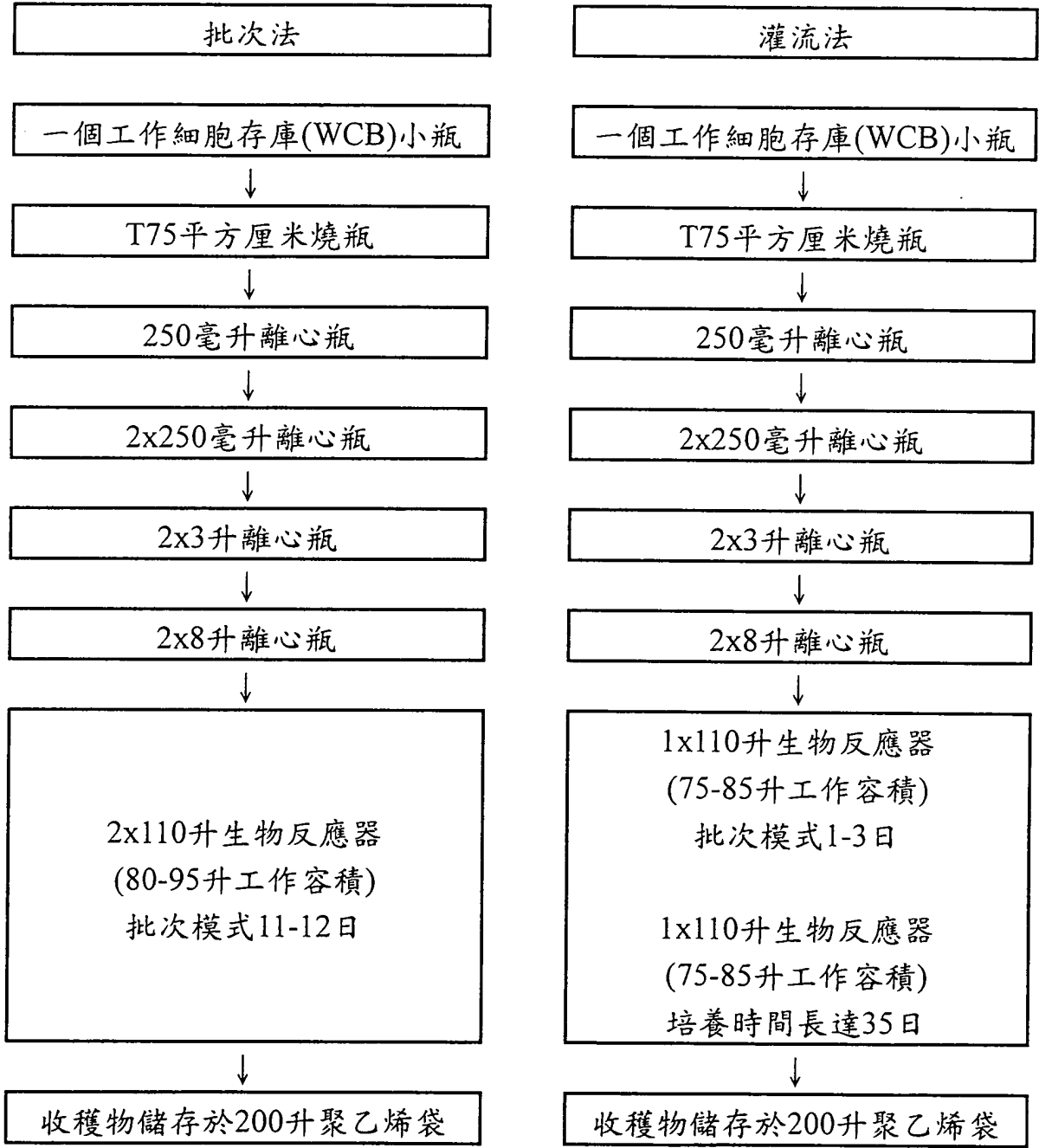


表 1C：批次饋料法與灌流法間之差異之摘要說明

製造步驟	說明(批次)	說明(灌流)
細胞培養	一批次為使用兩個110升生物反應器進行一次製造所得結果。	改變：一批次為使用一個110升生物反應器進行一回合製造操作的結果

WCB小瓶 解凍	各製造批次為1小瓶。 試驗：期望細胞存活率>95% 期望值 $\geq 1 \times 10^6$ 回收細胞	改變： 細胞存活率：>90%解凍時存活率>90%證實可獲得成功操作，以及符合規格的產物
↓		
T75平方厘米小瓶	約 5×10^6 細胞接種於一燒瓶。 步驟長度：約3日 試驗：期望細胞存活率>90% 期望值 $\geq 2 \times 10^7$ 回收細胞	無改變
↓		
250毫升 離心瓶	得自T75之細胞接種於250毫升離心瓶。 步驟長度：約2日 試驗：期望細胞存活率>90% 期望值 $\geq 2 \times 10^8$ 回收細胞	無改變
↓		
2x250毫升 離心瓶	得自1 x 250毫升離心瓶之細胞平分於兩個250毫升離心瓶 步驟長度：約3日 試驗：期望細胞存活率>90% 期望值 $\geq 4 \times 10^8$ 回收細胞	無改變
↓		
2x3升 離心瓶	得自2 x 250毫升離心瓶之細胞平分於兩個3升離心瓶 步驟長度：約4日 試驗：期望細胞存活率>90% 期望值 $\geq 4.8 \times 10^9$ 回收細胞	無改變
↓		
2x8升 離心瓶	得自2 x 3升離心瓶之細胞平分於兩個8升離心瓶 步驟長度：約2日	無改變

	試驗：期望細胞存活率>90% 期望值 $\geq 1.6 \times 10^{10}$ 回收細胞	
↓		
培養瓶之 接種	$\geq 0.8 \times 10^{10}$ 細胞接種物添加至 兩個生物反應器，各含32升 培養基。 以PC介面之控制系統監視培養。	改變： $\geq 1.6 \times 10^{10}$ 細胞接種物添加至 一個含64升培養基之生物反應 器(反應使用一個生物反應器 與使用兩個的比較。)
↓		
生產	生長：生長3日至培養到達 $> 3.2 \times 10^{10}$ 細胞密度。 垂直平分：培養基添加至終 容積95升。 收穫：上清液係於第11日收穫， 或當細胞存活率降至70%以下時 收穫。上清液經過濾及儲存。	改變： 生長/變遷/收穫：當細胞密度 達 $> 8 \times 10^{10}$ 細胞/毫升時開始灌 流。灌流速率以葡萄糖濃度為 基準，徐緩增加至每日5個容 器容積。當細胞密度 $> 1.28 \times 10^{12}$ 時，pH設定點調整為7.35。 一旦灌流速率的增加停止， 藉細胞排放減少細胞密度來維 持葡萄糖濃度。收穫所得上清 液經收集及過濾。
結束	該回合於收穫時結束。	改變： 於35日或35日以上結束操作， 或於活性降至低於2毫克/升連 續3日、或於收集足夠之收穫 上清液後結束操作。

規模放大之接種物的製備對批次饋料法及灌流法皆相同。一具體實施例中，將得自工作細胞存庫之單一小瓶解凍，將小瓶內容物(約1毫升)移至T75平方厘米細胞培養瓶內約25毫升EX-CELL 302培養基(改性w/L-麩胺，不含酚紅)開始rhASB細胞培養。於各個擴增階段，細胞培養係孵育至存活

細胞數目到達約 0.8×10^6 細胞/毫升為止。各個細胞擴增步驟皆監視細胞的生長(細胞密度)及存活率(透過色潘藍(trypan blue)排除法監視存活率)。EX-CELL 302培養基(改性w/L-麩胺，不含酚紅)培養基的添加以及細胞的移轉皆係以無菌方式於層流罩斗內進行。細胞培養循序由T75平方厘米燒瓶擴增至250毫升離心瓶、至兩個250毫升離心瓶、至兩個3升離心瓶及最終至兩個8升離心瓶。整個規模放大過程持續約14日。當兩個8升離心瓶到達密度至少 1.0×10^6 細胞/毫升時，燒瓶用來播種一個110升生物反應器。

較佳rhASB表現或生產或製造之生物反應器操作係利用以灌流為主之細胞培養法。較佳使用灌流法之生物反應器可控制密度高達3千7百萬細胞/毫升；相反地，使用批次饋料法只可控制4-5百萬細胞/毫升。

以灌流為主之方法(35日)操作時間比批次饋料法(11-12日)更長，產生收穫之細胞培養流體(於每日5容器容積灌流速率，約400升/日)之容積比批次饋料法(190升/回合)更大量。較佳共收穫35日，共收集約8400升上清液。

生產細胞之終點(EPC)係遵照ICH指南對基因安定性、基因身份、無菌性以及偶發因子污染做評估。較佳於cGMP條件下產生的EPC結果AC60108(得自35日時間之生物反應器回合)未顯示生長或陰性結果或未偵測得任何細菌及真菌、黴菌、偶發病毒污染物、鼠病毒等污染物或粒子的存在。

於第四方面，本發明提供一種轉移基因細胞系，其特徵在於可製造讓酶可供治療用量之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯

酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物。較佳具體實施例中，本發明特徵在於一種重組中國倉鼠卵巢細胞系例如 CHO K1細胞系，其可穩定可靠地製造定量N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)，因而該酶可供治療用。特佳為定名為 CSL4S-342之CHO-K1細胞系。若干較佳具體實施例中，細胞系含有一或多個表現組成體。更佳細胞系含有約10套或10套以上之表現組成體。又更佳具體實施例中，細胞系可以每日每 10^7 細胞至少約20-80或40-80微克之數量表現重組N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)。

重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)可由定名為 CSL4S-342之穩定轉移感染CHO-K1(中國倉鼠卵巢)細胞系製造。該細胞系說明於參考文獻(Crawley，臨床研究期刊99:651-662(1997))。主細胞存庫(MCB)及工作細胞存庫(WCB)係於泰塔金(Tektagen)公司(賓州馬爾文)準備。細胞存庫係遵照ICH推薦之重組哺乳類細胞系指南決定特徵。

於第五方面，本發明提供新穎載體，其適合可以治療方式使用該酶之數量製造N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物。

於第六方面，本發明提供根據本發明方法製造之新穎N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物，藉此提供可供使用該酶做治療用之數量。根據本發明之N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之較佳比活性為約20-90單位，更佳大於50單位/毫克蛋白質。較佳酶具有去糖基化重量約55至56 kDa，最佳約55.7 kDa。較佳酶具有糖基

化重量約 63 至 68 kDa，且最佳約 64 至 66 kDa。本發明也包括天然人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之生物活性片段，包括截頭分子、類似物及突變株。

N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之人類 cDNA 預測 533 胺基酸蛋白質具有一個 41 胺基酸信號胜肽 (Peters 等人，生物化學期刊 265:3374-3381)。預測分子量於裂解信號胜肽之後約為 55.9 kDa。重組酶因碳水化合物改性，於 SDS-PAGE 具有名目分子量 64 kDa。預測蛋白質序列含有六個可能的 N 鍵聯寡糖改性位置，其中 4 個位置可使用，基於平均質量 2,000 kDa，預測質量與名目質量間之差異 8,000 kDa。分子內蛋白質之成熟形式有三個胜肽藉肽胺酸鍵附著。最大胜肽之分子量為 47 kDa；另外兩種胜肽具有分子量分別為 6 kDa 及 7 kDa。

根據本發明方法製造及純化之藥品說明示於表 2。

表 2：藥品初步規格

試驗	程序	規格
活性	螢光檢定分析	20,000-120,000 毫單位
偶發病毒*	試管內檢定分析	合格
外觀	目測	澄清、無色至灰黃色溶液
細菌內毒素	LAL	≤2 EU/mL
氯化物	原子吸收	報告值
ASB 纖維母細胞 吸收檢定分析	TBD	≤40 毫莫耳
黴漿菌*	考慮重點 1993	合格
微粒	USP	≤600/小瓶於 25 微米及 ≤6000/小瓶於 10 微米
PH	USP	5.5-6.8
磷酸鹽	原子吸收	報告值
蛋白質濃度	UV280	0.8-1.2 毫克/毫升

純度	SDS PAGE	1主代介於65-70 kDa間
	RP-HPLC	>95%
殘餘藍染料	TBD	報告值
殘銅	TBD	報告值
鈉	原子吸收	報告值
比活性	計算	40,000-80,000毫單位/毫克
無菌性	21 CFR 610	合格

*對生物反應器收穫之上清液試驗(藉過濾去除細胞後)。

於第七方面，本發明之特徵在於N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)或其生物活性片段、突變株或類似物之新穎純化方法。根據第一具體實施例，經過轉移感染之細胞物質經生長及去除而留下重組酶。外生性物質通常係由粗產物本體分離來防止管柱的穢垢。較佳含重組酶之生長培養基通過超濾及滲濾步驟。一種方法中，過濾後之溶液通過DEAE希法羅司(Sephacrose)層析術管柱，然後通過藍希法羅司層析術管柱，然後通過Cu⁺⁺螯合希法羅司層析術管柱，然後通過苯基希法羅司層析術管柱。此種四步驟之管柱層析術包括循序使用DEAE希法羅司、藍希法羅司、Cu⁺⁺螯合希法羅司及苯基希法羅司層析術管柱，結果獲得特高純化重組酶。熟諳技藝人士了解一或多個層析步驟可被刪除或取代、或於本發明範圍內各步驟順序可變更。其它較佳具體實施例中，得自最終層析術管柱之洗提分經過超濾/滲濾，進行適當步驟來去除任何殘餘病毒。最後可視需要進行適當消毒步驟。重組酶可根據圖2摘述之處理純化。重組酶之品質對病人有關鍵重要性。藉此種方法製造之rhASB為實質純質(>95%)。

較佳具體實施例中，超濾/滲濾步驟係以約10 mM之磷酸鈉溶液以及約100 mM之氯化鈉溶液於pH約7.3進行。另一具體實施例中，DEAE希法羅司層析術步驟係於pH約7.3進行，其中洗提劑溶液係以適當緩衝液較佳為氯化鈉及磷酸鈉緩衝液調整。另一較佳具體實施例中，藍希法羅司層析術步驟係於pH約5.5進行，其中洗提劑溶液係以適當緩衝液較佳為氯化鈉及乙酸鈉緩衝液調整。又較佳具體實施例中，Cu⁺⁺螯合希法羅司層析術步驟係使用含氯化鈉及乙酸鈉之洗提緩衝液進行。特佳具體實施例中，第二超濾/滲濾步驟係於得自各層析術回合之洗提劑進行，其中重組酶於調配緩衝液(如氯化鈉及磷酸鈉緩衝液)濃縮至約1毫克/毫升濃度，調整至pH約5.5至6.0且最佳pH 5.8。磷酸鹽緩衝液為該處理使用之較佳緩衝液，原因在於磷酸鹽緩衝液可防止關鍵性分解，且改善酶安定性。

於本發明範圍之特佳純化法之進一步細節說明陳述於表3。

表3：純化方法綜論

步驟	方法
1. UF/DF	過濾後之收穫液(HF)濃縮10倍，然後使用切線流過濾(TFF)系統，使用5倍容積10 mM磷酸鈉、100 mM NaCl，pH 7.3滲濾
	↓
2. DEAE希法羅司FF (流經)	• 預洗1緩衝液：0.1 N NaOH • 預洗2緩衝液：100 mM NaPO₄，pH 7.3 • 平衡緩衝液：100 mM NaCl、10 mM NaPO₄，pH 7.3 • 載荷：得自步驟1產物 • 洗滌緩衝液：100 mM NaCl、10 mM NaPO₄，pH 7.3

	• 汽提緩衝液：1 M NaCl、10 mM NaPO₄，pH 7.3 • 消毒緩衝液：0.5 N NaOH • 儲存緩衝液：0.1 N NaOH
	↓
3. 藍希法羅司 FF	• 預洗1：0.1 N NaOH • 預洗2：H₂O • 預洗3：1 M NaAc，pH 5.5 • 平衡緩衝液：150 mM NaCl、20 mM NaAc，pH 5.5 • 載荷：DEAE流經 • 洗滌緩衝液：150 mM NaCl、20 mM NaAc，pH 5.5 • 洗提緩衝液：500 mM NaCl、20 mM NaAc，pH 5.5 • 再生緩衝液：1 M NaCl、20 mM NaAc，pH 5.5 • 消毒緩衝液：0.1 N NaOH，0.5-2小時 • 儲存緩衝液：500 mM NaCl、20 mM NaAc，pH 5.5，20% ETOH
	↓
4. Cu ⁺⁺ 螯合 希法羅司FF	• 消毒緩衝液：0.1 N NaOH • 洗滌緩衝液：H₂O • 電荷緩衝液：0.1 M硫酸銅 • 平衡緩衝液：20 mM NaAc、0.5 M NaCl、10%甘油，pH 6.0 • 載荷：藍希法羅司洗提劑 • 洗滌緩衝液1：20 mM NaAc、0.5 M NaCl、10%甘油，pH 6.0 • 洗滌緩衝液2：20 mM NaAc、1 M NaCl、10%甘油，pH 4.0 • 洗滌緩衝液3：20 mM NaAc、1 M NaCl、10%甘油，pH 3.8 • 洗提緩衝液：20 mM NaAc、1 M NaCl，10%甘油，pH 3.6 • 汽提緩衝液：50 mM EDTA、1 M NaCl • 消毒緩衝液：0.5 N NaOH，0.5-2小時

	• 儲存緩衝液：0.1 N NaOH
	↓
5. 苯基希法羅司HP	• 預洗1緩衝液：0.1 N NaOH • 預洗2緩衝液：H₂O • 平衡緩衝液：3 M NaCl、20 mM NaAc，pH 4.5 • 載荷：Cu⁺⁺螯合希法羅司洗提劑 • 洗滌緩衝液1：3.0 M NaCl、20 mM NaAc，pH 4.5 • 洗滌緩衝液2：1.5 M NaCl、20 mM NaAc，pH 4.5 • 洗提緩衝液1：1.0 M NaCl、20 mM NaAc，pH 4.5 • 汽提緩衝液：0 M NaCl、20 mM NaAc，pH 4.5 • 消毒緩衝液：0.5 N NaOH • 儲存緩衝液：0.1 N NaOH
	↓
6. UF/DF	純化後之rhASB經濃縮且使用TFF系統於調配緩衝液(150 mM NaCl、10 mM NaPO ₄ ，pH 5.8)滲濾至終濃度1.5毫克/毫升
	↓
7. 調配(若有所需)	• 以額外調配緩衝液稀釋至1.0毫克/毫升
	↓
8. 病毒減少/ 無菌過濾	• 0.02微米過濾入無菌容器
	↓
9. 裝瓶	• 產品填裝於5 cc第1型玻璃小瓶，以人工加蓋、捲邊及加標籤

調配後之本體藥品可於類別100之層流罩斗下通過0.04微米或較佳2微米過濾器過濾入第1型玻璃小瓶內消毒。小瓶使用半自動液體填充機填充至終容積約5毫升。然後小瓶以人工加蓋、密封及加標籤。

更佳前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之純化方法包

含：(a)獲得流體含有前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；(b)減少該流體中可裂解前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之蛋白酶之蛋白質分解活性，其中該降低不會有損該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；(c)該流體接觸希布康藍(Cibracon blue)染料交互作用層析術樹脂；(d)流體接觸銅螯合層析術樹脂；(e)流體接觸苯基疏水交互作用層析術樹脂；以及(f)回收前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。較佳循序進行步驟(c)、(d)及(e)。此種方法需要不多於三個層析步驟或管柱。為了獲得高度純化之前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，無需進一步的層析步驟或管柱。此種方法不含流體接觸DEAE希法羅司樹脂。回收之前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶具有至少等於或大於99%純度。總回收產率至少約40-60%。

較佳獲得含有前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之流體包含生長一編碼N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之基因轉形之細胞培養；較佳基因編碼人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。較佳細胞為哺乳類細胞。更佳哺乳類細胞為中國倉鼠卵巢細胞。獲得步驟進一步包含由細胞培養收穫流體。獲得步驟進一步包含濃縮流體至約20倍。

此種方法之特徵為蛋白酶活性與前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶溶液分開。此種分離包含(1)降低、抑制或去活化蛋白酶活性；或(2)由前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶實體上分離蛋白酶。較佳此項分離係於純化過程儘早進行。其目的係為了保持前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶被

裂解成為成熟形式或加工形式及/或其它分解形式之分子數目最小化。N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之前驅物形式為較佳形式，此種形式與成熟形式或加工形式相反，原因在於其較為容易吸收入目標組織，供隨後鎖定目標於溶小體。蛋白酶活性愈早或愈快由前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶分離：則前驅物形式被裂解成為成熟形式或加工形式的分子數目愈少。

蛋白酶活性係經由調整流體至約4.8至8.0之pH而被降低或抑制。較佳pH值為約4.8至5.5。更佳pH值為約4.8至5.2。預定降低之蛋白酶比活性為可特異性裂解N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶前驅物形式成為成熟形式或加工形式之蛋白酶活性。蛋白酶活性出現於一或多種半胱胺酸蛋白酶。可特異性裂解前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之半胱胺酸蛋白酶為組織蛋白酶L。此種組織蛋白酶L於去活化形式具有分子量約36 kDa，當暴露於pH小於5.0時轉成活性形式，尺寸約21-29 kDa(參考圖9C)。pH可調整至讓蛋白酶不會由去活化形式轉成活化形式之任何pH值，且期望之前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶或其生物活性不會受損或非不可逆地受損之pH值。

較佳步驟(c)包含流體通過希布康藍染料交互作用層析術管柱。更佳希布康藍染料交互作用層析術管柱為藍希法羅司6快速流管柱。較佳步驟(d)包含流體通過銅螯合層析術管柱。更佳銅螯合層析術管柱為螯合希法羅司快速流管柱。較佳步驟(e)包含流體通過苯基疏水交互作用層析術管柱。

。更佳該苯基疏水交互作用層析術管柱為苯基希法羅司6快速流高次管柱。較佳步驟(c)、(d)及(e)之時間順序為步驟(c)、步驟(d)及步驟(e)。

回收步驟包含超濾及/或滲濾流體。回收包含過濾流體去除DNA及/或過濾流體去除病毒。供去除病毒之過濾包含流體通過0.02微米過濾器。

此種方法也可用來純化N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶或其生物活性片段、類似物或突變株。

rhASB之純度係使用反相高效液相層析術(「RP-HPLC」)量測或測定，該層析術係基於疏水性的差異來分離蛋白質。此種檢定分析使用C4管柱(芬美朱特(Phenomenex Jupiter))作為靜相，以及水：乙腈梯度作為動相。蛋白質樣本初步注入管柱之水中；於此等條件下，全部蛋白質將結合至管柱。逐漸提高乙腈濃度輸注通過管柱。此種乙腈梯度可提高動相的疏水性，直至個別蛋白質變成可溶於動相且由管柱洗提出為止。此種洗提時間可對混合物中之個別蛋白質準確再現。蛋白質藉210奈米之紫外光吸收可於層析圖上偵測為尖峰。各個尖峰面積經求出，樣本純度係求出為層析圖之rhASB尖峰面積對全部尖峰總面積之比。RP-HPLC為經過證實測定rhASB之高解析度可再現性方法。

於本案之前的研究指出ASB之純度係進行雜質蛋白質ELISA測定。此種使用雜質蛋白質ELISA之方法(其細節未揭示)可使用對可能之宿主細胞雜質蛋白質混合物而提引出之抗體。ELISA係使用該可能雜質蛋白質混合物用來產生抗

體之標準曲線進行。試樣可相對於此種標準混合物對雜質濃度定量。此種檢定分析為蛋白質純化之有價值工具，但用於測定產品純度比RP-HPLC不準確，理由如後：

(1)RP-HPLC檢定分析中，rhASB及雜質之比例皆係藉相同量測(紫外光吸光比)測定。於ELISA，雜質純度係藉抗體結合測定，而目標蛋白質含量係藉另一種檢定方法(通常為紫外光吸光比或布拉福(Bradford)方法)測定。「純度百分比」值係以具有相同單位且實驗上藉相同方法測定之兩種數量比求出。

(2)為了讓ELISA的效果良好，藉抗體偵測得之樣本具有與標準品之相同蛋白質組成。對雜質蛋白質ELISA的情況相當不可能。用於此型檢定分析之檢定分析標準品為多種個別蛋白質混合物，對該混合物產生抗體。但純化後之rhASB產物只存在有一小組雜質蛋白質。因此抗體將偵測不同的蛋白質混合物，而反應相對於標準品可能非線性反應。發生此種情況時，檢定分析對各個樣本稀釋液獲得不同的淨值，因此無法了解何者稀釋液(若有)獲得正確值。

(3)此外，並非全部可能的雜質蛋白質對用來產生抗體的動物例如兔皆具有免疫原性或免疫原性至相等程度。因此藉ELISA測得的雜質含量只能反映出1小組存在於純化後產物的雜質。產物中可能有一或多種主要雜質完全無法偵測。相反地，因紫外光吸光比是一種蛋白質分子的通用性質，故RP-HPLC可偵測全部蛋白質。

(4)最後，純化後藥物產物有兩類雜質：產品無關雜質(前

文討論之宿主細胞蛋白質)及產品相關雜質(分解產物，包括加工形式及聚集體)。產品相關雜質無法藉雜質 ELISA 偵測，但藉 RP-HPLC 方便偵測。

因此由雜質蛋白質 ELISA 所得之實際數目經常成問題，RP-HPLC 的數目較可靠。

此外，SDS-PAGE 分析允許偵測宿主細胞雜質以及預定藥物蛋白質產物之加工形式或分解形式二者。當 SDS-PAGE 結合西方墨點分析使用時，來自宿主細胞污染物之蛋白質無關雜質可與蛋白質相關雜質區別。最後，SEC-HPLC 允許定量產品相關雜質含量，原因在於其可偵測不同分子量雜質，包括低分子量蛋白質加工形式或分解形式以及單體、二元體及其它多元體。

此種純化方法之具體實施例說明於表 4。

表 4：純化方法

步驟	方法
收穫過濾	• 經澄清過濾器、0.45微米過濾器及最終0.2微米過濾器過濾 • 過濾後匯集之收穫物儲存於聚丙烯袋內
UF 濃縮	• 平衡與沖洗：100 mM 磷酸鈉，pH 7.3 • 載荷：經過過濾後之收穫流體 • 濃縮：濃縮至20倍 • 過濾：稀釋後產物經0.2微米過濾器過濾入儲存容器
pH調整及過濾	• pH調整：添加10%冰醋酸至匯集之20倍濃縮物至終pH等於或小於約7.3；較佳pH約為4.0至7.3；更佳pH約4.5至5.5；又更佳pH約5.0 • 載荷：經過匯集之20倍濃縮物 • 清洗：注射用水(WFI) • 經澄清過濾器及0.2微米過濾器過濾 • 沖洗：20 mM 乙酸鈉、120 mM 氯化鈉，pH 5.0 • 回收產率至少約83%

希布康藍染料交互作用層析術管柱(藍希法羅司6 FF) (藍，藍希法羅司)	• 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 平衡：10 mM磷酸鈉，pH小於約6.5；較佳pH為約5.0至6.5；更佳pH為約6.45 • 載荷：pH經調整且經過濾之匯集的20倍濃縮物 • 洗滌：10 mM磷酸鈉，pH 6.45 • 洗提：10 mM磷酸鈉，125 mM氯化鈉，pH 6.45 • 再生：10 mM磷酸鈉，1.0 M氯化鈉，pH 6.45 • 消毒：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌1：注射用水(WFI) • 洗滌2：10 mM磷酸鈉，1.0 M氯化鈉，pH 6.45 • 儲存：20%乙醇 • 回收產率至少約84%
銅螯合層析術管柱(螯合希法羅司FF) (銅，CC，銅-螯合)	• 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 電荷緩衝液：0.1 M硫酸銅 • 平衡：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH小於約6.0；較佳pH為約3.6至5.5；更佳pH為約5.5 • 載荷：經由添加100 mM乙酸鈉、2.0 M氯化鈉、50%甘油，pH 5.2，調整經過匯集之藍洗提產物之甘油含量至10% • 洗滌1：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 5.5 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 3.9 • 洗提：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 3.6 • 洗提分維持30-120分鐘隨後以0.5 M NaOH調整至pH 4.5 • 再生：50 mM EDTA，1.0 M氯化鈉，pH 8.0 • 消毒：0.5 M氫氧化鈉 • 儲存：0.1 M氫氧化鈉 • 回收產率至少約86%
苯基疏水交互作用層析術管柱(苯基希法羅司6 FF高次)	• 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 平衡：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH為約4.5至7.1；較佳pH為約4.5 • 載荷：藉添加20 mM乙酸鈉、5 M氯化鈉，pH 4.5調整銅洗提劑之氯化鈉含量至2 M

(苯基，苯基高次)	• 洗滌1：10 mM磷酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 7.1 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 洗提：20 mM乙酸鈉，250 mM氯化鈉，pH 4.5 • 再生：20 mM乙酸鈉，pH 4.5 • 消毒：0.5 N氫氧化鈉 • 儲存：0.1 N氫氧化鈉 • 回收產率至少約88%
UF/DF，DNA過濾，病毒過濾，調配	• 平衡：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8 • 濃縮：濃縮至NMT 1.5毫克/毫升 • 滲濾：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8 • DNA過濾：產物通過DNA過濾器過濾 • 病毒過濾/稀釋：產物通過0.02微米過濾器過濾且稀釋至1.0毫克/毫升 • 調配：添加濃度50微克/毫升之波利索貝80 • 過濾：稀釋後產物通過0.2微米過濾器過濾入儲存容器

如此所得藥物產物成分列舉於表5。於本發明範圍之藥物產物組合物成分列舉於表6。

表5：藥物產物成分

成分	說明
活性成分	重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶
賦形劑	磷酸鈉，一鹼基，1 H ₂ O
	磷酸鈉，二鹼基，7 H ₂ O
	氯化鈉
容器	金寶(Kimble)玻璃I型5毫升透明玻璃小瓶，硼矽酸鹽西方藥品公司，S-127 4432150灰色蓋

表6：藥品產物組合物

成分	數量
RhASB	1毫克/毫升
磷酸鈉，一鹼基，1 H ₂ O	9 mM
磷酸鈉，二鹼基，7 H ₂ O	1 mM
氯化鈉	150 mM

已經說明本發明，提出下列實施例供舉例說明本發明而

非限制性。

實施例 1

以重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶進行臨床評比
摘要

重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)之適應症為治療MPS VI，也稱做馬洛投-拉米症候群。發明人提出一種rhASB之臨床發展計畫，包含初期開放標籤臨床試驗，提供每週輸注酶之安全性、藥力學以及代理終點及經界定的臨床終點之初期反應。試驗至少進行三個月來對5位可評估的病人收集足夠的安全性資訊。此時，若初劑量1毫克/公斤無法產生尿中過量糖胺基聚糖的合理下降，或無法產生顯著直接臨床效果，則將劑量加倍，又維持三個月來確定安全性以及評估進一步功效。

目的

發明人的主要目的係證實每週輸注rhASB對患有MPS VI病人至少經歷三個月時間之安全性。安全性之量測包括不良事件、免疫反應及過敏反應(補體活化、對重組酶之抗體生成)、完整臨床化學評審(腎功能及肝功能)、尿液分析以及區別CBC。

一種次要目的係經由監視已知於MPS VI將受影響之若干參數變化來評比功效。此等評比包括6分鐘走路試驗(測量運動耐力)、完整肺功能(PFT)評比、尿液糖胺基聚糖以及肝臟腫大(作為腎及肝GAG儲存測量)程度的降低、生長速度、關節活動範圍、兒童健康評估問卷(CHAQ)、視銳度、心

臟功能、睡眠研究以及兩種不同的全面性評估；一種係由調查人員進行，另一種係由病人/照顧者進行。第二種次要目的係測定輸注藥物於血循環之藥力學參數，以及使用白血球及面頰組織作為組織來源測定胞內酶之一般性分布及半生期。預期此等測量值將有助於基於輸送至細胞溶小體之酶濃度來找出劑量與臨床反應的關係。

方法

發明人進行單一中心之開放標籤研究來證實 rhASB 用於 MPS VI 病人之安全性，以及評估 rhASB 之臨床治療參數。病人住院兩週，基準線評估包括醫療病史及身體檢查、精神科試驗、耐性試驗(跑步機)、臨床檢驗的標準集合(CBC、評審 20、CH50、UA)，身體 MRI 或 CAT 掃描(肝及脾之容積測定、骨及骨髓評估、淋巴節及扁桃腺大小)、心臟學評估(心臟超音波、EKG、CXR)、呼吸道評估(肺功能試驗)、睡眠研究來評比睡眠中間之呼吸阻塞事件、關節限制分析(測定肘關節以及指關節之活動範圍)、LP 伴以 CNS 壓力以及生化研究(兩種情況之頰 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶活性、白血球 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶活性、三種情況之尿液 GAG、抗 rhASB 抗體之 ELISA 了解血清之生成以及 24 小時尿液進行肌酸酐廓清率測試)。除了前述評比之外，各個病人經過拍照以及拍攝錄影帶來觀察其進行某些肉體活動，例如試圖將手抬高超過頭以及步行。使用抗組織胺滴定病人，讓藥劑的前處理可有效用於酶輸注之前。提議人用劑量 1 毫克/公斤 (50 單位/公斤) 係每週以 4 小時時間靜脈輸注進行。

病人頭兩週留在醫院，接著4週短期待在醫院。最後6週的處理係在接近病人家中的診所進行。病人於滿3個月時回到醫院接受完整的評估。若需要將劑量升高至2毫克/公斤，則病人遵循前述計畫經歷前12週。任一種情況下於參與試驗開始6個月皆進行完整評估。整個試驗期間監視安全性。完成試驗的病人將遵照長期治療方案繼續治療，只要安全性及功效條件保障其可繼續用到BLA核准為止。

病人數以及徵召率

於試驗開始時徵召單一病人，一個月後又徵召兩位病人，若該處理並無任何可預見之併發症，則兩週後再徵召兩位病人。若有任何被徵召的病人生病或若兒童需要緊急臨床手術拯救有生命威脅的疾病或有害疾病時，則再讓其它病人住院進行研究。

診斷以及含括標準/排除標準

病人可為男性或女性，5歲或5歲以上，由MPS VI診斷記錄，經由可量測之MPS VI臨床徵相及症狀確認，且由纖維母細胞或白血球ASB酶活性降低獲得證實。育齡婦女在每次投藥前必須經過驗孕證實為陰性(尿液 β -hCG)，且應勸告其於整個研究期間使用醫療上可接受的避孕方法。若病人先前曾經接受骨髓移植、懷孕或哺乳於徵召研究之前30日內曾經接受研究藥物、或患病、嚴重復發性疾病或其它可能顯著降低遵照研究進行的情況則由本研究中排除。

劑量、途徑及用法

病人於研究的頭3個月接受rhASB劑量1毫克/公斤(約50單

位/公斤)。若尿液GAGs過量無法降低達合理量，且未見任何臨床效果，則劑量加倍。唯有在全部5位病人都已經進行3個月的治療後才可以提高劑量。此種rhASB劑型係每週一次以約4小時時間經靜脈投藥，至少連續12週。末梢靜脈導管留置於頭皮靜脈或其它適當靜脈，鹽水輸注始於30 cc/小時。病人將基於試驗前所做的滴定實驗，前驅投藥高達1.25毫克/公斤二苯基海明(diphenylhydramine)，靜脈輸注。rhASB稀釋於100 cc補充1毫克/毫升人類白蛋白之生理食鹽水。稀釋後之酶以1毫克/公斤(約50單位/公斤)經4小時時間輸注，同時監視心跳、呼吸以及脈衝氧計量。病人做臨床監視以及監視任何對輸注的不良反應。若觀察到任何不尋常的症狀包括(但非限制性)不適、呼吸急促、血氧過低、低血壓、心博過速、噁心、寒戰、發燒及腹痛，則即刻停止輸注。基於臨床症狀及徵相，投予額外劑量之二苯基海明、氧氣罩、靜脈注射大劑量流體或其它適當的臨床介入例如使用類固醇治療。若確實發生急性反應，則需測試血清中的補體耗用量。使用第二個靜脈位置來做藥力學分析所需的採血樣之用。

可評估之病人

只要在12週治療期間並未錯過超過兩次非循序之輸注，則該病人所得資料視為可供評估。需完成初期、中點及終評估。

安全性

若酶之治療並未發生任何顯著急性反應，而該急性反應

無法藉變更酶投藥速率或緊急使用抗組織胺或類固醇防止，則該酶治療判定為安全。酶之長期投藥若於臨床檢查、臨床檢驗或其它適當研究並未觀察得顯著異常，則該酶之長期投藥判定為安全。存在有抗體或補體的活化本身不被視為不安全，但此種抗體需藉ELISA監控或藉臨床評估可能之免疫複合症監控。

功效

本研究之一目的係評比重要實驗設計可能的終點。代理終點以及臨床終點的改善係以酶輸送以及由身體去除糖胺基聚糖儲存含量之結果加以預測。若藉合理用量超過3個月未見尿液糖胺基聚糖濃度過量平均值的下降，且於3個月時未見臨床改善，則須升高劑量。改良預期可媲美於晚近完成之MPS I臨床試驗觀察得的改良，須包括改良之呼吸道指標或睡眠絕息的解決、關節活動性的改善以及耐力的增加。

實施例2

MPS VI貓及相關藥理學及毒理學研究之資訊綜論呈示如後：酶補充治療已經建立為多種遺傳代謝病例如高橋氏病 (Gaucher Disease)、法伯利氏病 (Fabry Disease) 以及黏多醣病 I 之有展望的治療之道。若干此等病症中，天然動物模式提供預測於臨床前期研究期間人類治療之臨床功效之道。發現於MPS I (犬研究模式) 為真。牢記此點，於開始此疾病之人類研究之前，使用MPS VI貓進行研究。存在有足夠之安全性及功效資料來與MPS VI病人進行臨床試驗。

rhASB MPS VI貓之研究指出，並無任何貓因投藥而死亡。

如所預測，MPS VI貓之實驗也指示rhASB之吸收係與甘露糖6-磷酸改性碳水化合物支鏈的存在有相依性。MPS VI貓之rhASB也顯示可由多個重要器官清除儲存的糖胺基聚糖，且中度改變骨密度。長期之劑量範圍功效研究，提示1毫克/公斤/週劑量為顯著臨床功效的最低濃度。也進行研究來比較於大劑量注射以及緩慢(2小時)輸注後之酶之分布、組織糖胺基聚糖存量的清除、以及尿液糖胺基聚糖濃度的下降。目前正在進行的研究持續評比每週輸注臨床劑量1毫克/公斤rhASB於患有MPS VI之貓之安全性。

於不同族暹羅貓之自發型MPS VI係於1970年代經識別(Jezyk，科學198:834-36 (1977))，貓之病理變化細節報告已經公開(Haskins等人，美國病理期刊101:657-674 (1980)；Haskins等人，美國獸醫協會期刊182:983-985 (1983)；Konde等人，獸醫放射學28:223-228 (1987))。雖然此等貓的臨床表現略有差異，但全部皆有參考文獻報告的一般性變化(Jezyk等人，科學198:834-36 (1977)；Konde等人，獸醫放射學28:223-228 (1987)；Crawley，「黏多醣病VI型貓研究模式之酶補充治療」博士論文，阿德烈大學澳洲阿德烈(1998))。表7係由此等來源組合獲得於未經治療之MPS VI貓預期觀察得的「平均」變化：

表 7：MPS VI貓研究模式

臨床觀察	開始時間	相對於人類疾病之改變 (與時間獨立無關)
• 臉部變形： • 小頭， • 寬頷， • 小耳	2月齡	• 與人類疾病類似

• 瀰漫性角膜混濁	2月齡	• 與人類疾病類似
• 骨骼異常： • 生長板發育不良， • 半脫臼， • 漏斗胸	初次徵相於2月齡-漸進性	• 與人類疾病類似-軟骨內鈣化的改變
• 體重減輕	3月齡	• 與人類疾病類似
• 頸椎彎曲度的減小	於各年齡正常貓之數值為180度。 患MPS VI： 3月齡：130-170度 5月齡：45-130度 6月齡：30-100度 11月齡：20-80度	• 與人類疾病類似
• 鬆骨病/退化性關節病	1歲或1歲以上	• 與人類疾病類似
• 後肢步態缺陷 • 後肢輕癱或麻痺(胸腰脊索壓迫)	參見下表	• 腕隧道症候群 • C ₁ -C ₂ 半脫臼 • 繼發於硬膜徵候之頸索壓迫，較為典型
• 粗略正常肝及脾		• 人類肝及脾腫大
• 心臟瓣膜增厚		• 與人類疾病類似
• 無CNS病變-輕微側腦室擴大		• 可媲美人類疾病的水腦

其它生化/形態學測定，指示至35日時，未經治療貓的器官已經有糖胺基聚糖於組織的最大存量(Crawley等人，臨床研究期刊 99:651-662 (1997))。正常貓及MPS VI貓出生時尿液糖胺基聚糖濃度升高，但於約40日齡後，正常貓的濃度下降。MPS VI貓之尿液糖胺基聚糖濃度維持高濃度，或持續升高至約5月齡後達到穩態。

同窩患病之小貓之臨床表現各異。除了特定異常出現時間不同之外，某些臨床變化及病理變化的進行時程也各有

不同。一般言之，骨病變典型為進行性(Konde等人，獸醫放射學，28:223-228 (1987))，而角膜混濁則否。此外發現某些麻痺貓隨著時間的經過可改善變成輕癱。有關個別貓疾病進行之細節研究受到臨床觀察(或放射性攝影觀察)所限。部分有獨特之病理交互關聯，例如繼發於胸腰區之骨質組織增生的神經缺陷以及脊索壓迫(Haskins等人，美國獸醫學會期刊182:983-985 (1983))。

使用重組貓ASB於新生MPS VI小貓進行為期6個月的酶補充治療功效研究。觀察到若干接受治療的MPS VI貓對人類酶發展出抗體而促成此項研究(參考6.5節)。此等抗體也變更酶的吸收及安定性(Brooks等人，Biochim. Biophys. Acta 1361:203-216 (1997))。貓酶係以1毫克/公斤每週輸注。研究主要獲得的結論為比較先前研究使用相等劑量人類重組酶，尿液GAG、體重/生長、骨骼形態以及儲存之糖胺基聚糖由若干組織的清除皆有改善；未偵測得任何超過正常貓之抗體以及以每頭貓做比較，貓酶劑量1毫克/公斤逆轉疾病的效果可媲美人類酶劑量5毫克/公斤(Bielicki等人，生物化學期刊，274:36335-43 (1999))。研究指示當由貓衍生之酶給予貓時，發現終點及免疫原性皆遞增改良。如此額外證實可以人類酶以1毫克/公斤/週投予人類病人。研究結果示於表8。

表8：於新生MPS VI貓每週大劑量注射CHO-衍生之重組貓ASB之功效

	結果	
劑量	1毫克/公斤	
持續時間	6個月(n=2)	3個月(n=3)
尿液GAGS	降至2倍正常值	降至2倍正常值

抗體力價	• 於正常貓觀察得之範圍	• 尚待完成
臨床		
外觀	• 持續角膜混濁 • 臉部變形略有緩和 • 體型改善	• 持續角膜混濁 • 臉部變形略有緩和 • 體型改善
重量	• 比正常重	• 比正常略輕
脊椎彎曲度 (正常=180度)	160度-180度	未檢驗
神經學	• 正常	• 正常
放射學	• 品質改善 • 骨密度及維度(類似參考文獻10之1毫克/公斤rh4S)	• 未檢驗
大體		
骨/軟骨厚度	• 可變；軟骨厚度縮小 • 軟骨下骨更均勻(類似1毫克/公斤rh4S)	• 未檢驗
脊索	• 無壓縮	• 未檢驗
細胞層面		
肝(庫佛 (Kupffer))	• 溶小體存量完全出清	• 溶小體存量完全出清
皮膚	• 存量幾乎完全減少	• 溫和減少
角膜/軟骨 (耳，關節)	• 比未經處理之MPS VI對照組，溶小體存量未出清	• 溶小體存量未出清
心臟瓣膜	• 溶小體存量顯著減少	• 尚待完成
主動脈	• 溶小體存量幾乎完全下降	• 溶小體存量溫和減少

表9顯示於MPS VI貓研究模式使用重組人類ASB進行之研究摘要。

表9. RhASB研究結果

貓頭數	劑量	持續時間(月)	投藥途徑	尿液GAGS	組織病理學
1	0.8毫克/公斤/14日	7-22	大劑量靜脈注射	比未經處理的貓降低50%	• 肝臟空泡的正常化 • 腎臟及皮膚顯著縮小
	1.5毫克/公斤/7日	22-27	大劑量靜脈注射		• 角膜及軟骨細胞並無修正

1	0.5毫克/公斤/14日	12-23	大劑量靜脈注射	降至接近正常	• 無腎臟免疫複合體沉積
	1.4毫克/公斤/7日	23-27	大劑量靜脈注射		
1	0.8毫克/公斤/14日	2-15	大劑量靜脈注射		
1	0.2毫克/公斤/8日	6	大劑量靜脈注射	比未經處理組只有邊際降低	不適用
4	1毫克/公斤/7日	5/6	大劑量靜脈注射	降低且維持正常值3倍，比較未經處理組為正常值10倍	• 肝細胞溶小體存量完全清除 • 並無腎功能受損或腎小球免疫複合體沉積證據 • 心臟瓣膜溶小體存量顯著減少 • 主動脈血管中層至血管外膜之存量呈梯階狀
1		11	大劑量靜脈注射		• 皮膚(髕關節、硬膜、腎)之溶小體存量溫和減少 • 無腎功能受損或腎小球沉積證據 • 角膜/軟骨之溶小體存量並無顯著改變
2	5毫克/公斤/7日	5/6	大劑量靜脈注射	降低且維持正常值2倍，比較未經處理組為正常值10倍	• 肝及皮膚(髕關節、硬膜、腎)溶小體存量完全清除 • 並無腎功能受損或腎小球沉積證據 • 心臟瓣膜溶小體存量接近完全降低 • 外側血管中膜有空泡化細胞之薄帶
1		11	大劑量靜脈注射		• 並無腎功能受損或腎小球沉積證據 • 心臟瓣膜溶小體存量接近完全降低 • 外側血管中膜有空泡化細胞之薄帶

2	0.5毫克/公斤每週兩次	6	大劑量靜脈注射	降至3倍正常值	• 肝溶小體完全清除 • 皮膚溫合至中度減少 • 心臟瓣膜溶小體存量可變地減少 • 主動脈溶小體存量溫和減少
2	1毫克/公斤/7日	1	長期輸注(2小時)	於初次或第二次注射後降至低於未經治療之MPS VI貓	• 經5次輸注後網狀內皮細胞之溶小體存量降低，心臟瓣膜及主動脈之溶小體存量降低及輕微
2			短時間輸注(10分鐘)		
5	1毫克/公斤/7日	6	長期輸注(2小時)		

實施例3

分布及可行性

進行初期研究來記錄酶的吸收與分布，且作為為了功效研究可能的終點之先導研究(Crawley等人，臨床研究期刊 97:1864-1873 (1996))。重組人類ASB每週一次或每兩週一次以0.5至1.5毫克/公斤劑量，大劑量注射患病貓。評比一頭未經處理MPS VI貓(貓D)，以及一頭正常貓提供比較數值。來自未經處理貓之資料進一步經由38頭其它未經處理貓之病史評估獲得證實。使用免疫檢定分析，於正常貓進行急性攝取及分布研究，允許偵測於正常貓酶存在下之人類ASB。

此等研究之主要結論驗證酶之吸收寬廣，但預期最主要為肝及脾吸收，如同於其它MPS動物研究模式之酶補充研究觀察所得。吸收功效係與酶存在之甘露糖6-磷酸改性碳水化合物支鏈有關。酶之半生期測得為2-4日。理論上酶確實由多個主要器官清除存量，確實中度變更骨密度。於年

齡較老之MPS VI貓角膜缺陷、骨形態缺陷及軟骨缺陷無法被有效治療。研究結果摘述於表10。

表10：摘要：MPS VI貓研究之分布/可行性

參數	發 現				
貓	A		B		C
	經處理之MPS VI		經處理之MPS VI		經處理之MPS VI
劑量	每14日0.8 毫克/公斤	每7日1.5 毫克/公斤	每14日0.5 毫克/公斤	每7日1.4 毫克/公斤	每14日0.8毫克/ 公斤
給藥年齡(月)	7*-22	22-27	12*-33	23-27	2*-15
輸注參數	經腦靜脈2-10毫升(PBS) 5-20分鐘				
血漿 $t_{1/2}$ (大劑量靜脈注射)	• 13.7±3.2分鐘@1毫克/公斤 • 45分鐘@7.5毫克/公斤				
	全部數值皆相對於正常貓輸注1毫克/公斤rhASB後4小時之內生性貓ASB酶 • 肝：495x • 脾：6x • 肺：22.3x • 心：4.3x • 主動脈：4x • 皮膚：31x • 軟骨：0x • 角膜：0x				
組織 $t_{1/2}$	2-4日@1毫克/公斤大部分器官(於貓B大部分的組織皆有可偵測之酶，但貓A唯有於7日後肝臟才有可偵測之酶)				
神經學	• 步履不定，但較高劑量係改良		不適用		• 研究結束時邊際進展至輕癱程度
角膜混濁度	• 治療並無改變(處方後期隙燈檢查3次)				
骨骼(x光)每3個月拍4張	• 病變進行(未見放射性攝影的改良) • 骨容積增加/貓C的骨容積/骨小樑數目增加(接受早期處方) • 貓C之脊椎壓縮				
過敏休克	• 無過敏休克，輸注極少窘迫；				
抗體反應(Ig力價)未經處理MPS VI=4,000-32,000	1x10 ⁶ (血漿可於試管內抑制酶活性)		64,000		64,000
尿 液 GAGS (約400日)	• 比未經治療貓降低50%		• 降至接近正常		

尿液硫酸皮膚素(約400日)	• 全部3頭貓皆在中途(相對於未經治療之對照貓D及正常貓)
體重	• 2.5-3.0公斤比較正常4-7公斤
肝/脾	• 大體正常
心臟瓣膜	• 大體正常
軟骨	• 厚度及成形異常
顯微術(空泡)	• 肝空泡正常 • 腎及皮膚顯著減少 • 角膜及軟骨細胞並無改正
腎免疫複合體沉積	• 不存在

實施例 4

出生開始接受處理之 MPS VI 貓之功效

MPS VI 貓始於出生，接受長期一定劑量範圍之功效研究 (Crawley 等人，臨床研究期刊 99:651-662 (1997))，摘述於表 10。

MPS VI 貓始於出生，每週大劑量靜脈輸注 0.2、1 及 5 毫克/公斤 rhASB 劑量。共 9 頭貓接受處理 5、6 或 11 個月。此外，12 頭 MPS VI 貓以及 9 頭正常貓含括作為未處理的對照組。主要結論為 0.2 毫克/公斤劑量於接受研究之一頭貓無法改變疾病的進行，唯一有記錄的臨床效果是肝庫佛細胞存量減少。

較高劑量組於試驗期間，尿液 GAG 濃度降至接近正常。除了主要器官的改善之外，由出生開始高劑量治療可預防或改善脊椎骨骼變形、以及多種骨骼的異常成形。於 L-5 椎骨礦物容積、骨小樑厚度、以及骨表面密度，介於 1 至 5 毫克/公斤劑量發現有劑量相依性之功效改進，但 5 個月對 6 個月 ERT 之骨成形速率之改良相等 (Byers 等人，骨 21:425-431 (1997))。

僧帽瓣及主動脈與劑量有相依性，於 1 毫克/公斤之相依性較不完全，但於 5 毫克/公斤之相依性幾乎完全。於兩種劑量之軟骨及角膜存量皆未見改善。研究提示 1 毫克/公斤/

週劑量為出現顯著臨床效果之最低濃度。研究結果摘述於表 11。

表 11：於新生 MPS VI 貓每週大劑量注射 CHO-衍生之重組貓 ASB 之功效 (研究 PC-BM102-002)

	結果			
劑量	1毫克/公斤		5毫克/公斤	
持續時間	5/6月	11月	5/6月	11月
N	4	1	2	1
生化				
尿液GAGs	• 降低且維持正常值3倍，比較未經處理組為10倍正常值		• 降低且維持正常值2倍，比較未經處理組為10倍正常值	
臨床				
外觀	• 可變變化； • 藉隙燈證實角膜混濁持續		• 可變變化； • 藉隙燈證實角膜混濁持續	
重量	• 中等(無處方相對於正常)		• 中等(無處方相對於正常)	
脊椎彎曲度 (正常=180度)(未處理MPS VI=90度)	130-160度	90度	180度	160度
神經學	• 1/4後肢輕癱	• 無缺損	• 無缺損	• 無缺損
放射學	• 骨品質、密度及尺寸改善		• 骨品質、密度及尺寸改善 • 可能優於1毫克/公斤	
大體				
骨/軟骨厚度	• 可變但改善	• 存在有退化性關節病	• 可變但改善	• 存在有退化性關節病
脊索	• 1/4患有數種輕度壓迫	• 無壓迫	• 無脊索壓迫	
細胞層面				
肝(庫佛(Kupffer))	• 完整溶小體 存量清除	• 維持	• 完整溶小體 存量清除	• 維持

皮膚(髖關節、硬膜、腎)	· 無腎功能受損或腎小球免疫複合體沉積證據	· 溶小體存量溫和減少 · 無腎功能受損或腎小球沉積證據	· 完全清除溶小體存量 · 無腎功能受損或腎小球沉積證據	· 維持 · 無腎功能受損或腎小球沉積證據
角膜/軟骨(耳，關節)	不適用	· 溶小體存量無顯著變化	不適用	· 溶小體存量無顯著變化
心臟瓣膜	· 溶小體存量顯著(可變)降低	· 溶小體存量顯著(可變)降低接近完全	· 溶小體存量接近完全降低	
主動脈	· 由血管中層至血管外膜呈現存量梯度		· 外側血管中膜出現空泡狀細胞薄帶	

實施例5

新生 MPS VI 貓每週兩次輸注重組人類 ASB 之功效

對新生貓進行為期6個月的研究來評比每週兩次輸注0.5毫克/公斤之功效。此外，本研究使用之酶排它地係衍生自CSL-4S-342細胞系。研究之主要結論包括與先前報告之1毫克/公斤每週劑量做比較，本研究之物理、生化、神經學及放射性攝影參數皆產生類似的改善。最顯著差異為頸椎彎曲度略微惡化，較緻密的結締組織例如心臟瓣膜及主動脈之溶小體存量之廓清較少。結果摘述於表12。

表12：於新生 MPS VI 貓每週兩次大劑量注射 CHO-衍生之重組人類 ASB 之功效

參數	結果
劑量	0.5毫克/公斤
持續時間	每週兩次：6個月(n=2；225頭雌貓，226雄貓)
尿液GAGs	· 降至3倍正常值
抗體力價	· 於正常貓觀察得之範圍
臨床	
外觀	· 持續角膜混濁

	• 臉部變形略有緩和 • 體型改善
重量	• 中間(介於未處理與正常間)
脊椎彎曲度(正常=180度)	90度-150度
神經學	• 無後肢麻痺
放射學	• 品質改善，骨密度及維度(類似參考文獻110之1毫克/公斤rh4S)
大體	
骨/軟骨厚度	• 可變；軟骨厚度縮小以及軟骨下骨更均勻(類似1毫克/公斤rh4S)
脊索	• 無壓縮
細胞層面	
肝(庫佛)	• 完全清除溶小體
皮膚	• 存量輕度至中度減低
角膜/軟骨(耳，關節)	• 比未經處理之MPS VI對照組，溶小體存量未出清
心臟瓣膜	• 溶小體存量有可變降低(225頭雌貓完全下降；226頭雄貓於未處理組無改變)
主動脈	• 溶小體存量輕微降低

實施例 6

於 MPS VI 貓酶吸收與分布隨酶輸注速率之函數變化之評比

本研究之主要目的係比較大劑量輸注後與緩慢(2小時)輸注相同 1 毫克/公斤劑量後之酶分布、組織 GAG 存量清除、以及尿液 GAG 濃度的下降。緩慢投藥方案係基於 α -L-伊杜糖苷酶用於治療 MPS I 之臨床前期研究及臨床研究之經驗。此外研究首度提供資料，於百歐馬林(BioMarin)由 CSL-4S-342 細胞系製造的酶具有生物活性且安全。本研究之主要結論包括本研究處理之全部 4 頭貓(每組兩頭)對緩慢輸注或快速輸注皆未顯示不良影響，重複輸注酶也無有害效應。但大

劑量輸注導致肝吸收量高，並不佳。緩慢輸注之組織分布較佳，因此為臨床研究之較佳方法。

研究所得rhASB之組織分布提示2小時輸注除了肝臟之外也可提高其它器官的酶濃度，包括提高腦部活性。恰於第一次或第二次輸注後，觀察得尿液GAG下降至低於未處理MPS VI貓觀察得之濃度。於5次輸注後於網狀內皮細胞觀察得溶小體存量的修正，而若干纖維母細胞(心臟瓣膜)及平滑肌細胞(主動脈)之溶小體存量修正極輕微。任一組皆未觀察得對輸注之其它顯著臨床反應，但由於研究時間短，且治療係始於已經出現顯著疾病變化之後才開始治療，故此點並不出人意外。長時間2小時輸注比先前各項研究使用之較短時間輸注較安全且耐受性良好。基於1頭可評估酶組織分布之貓之結果，2小時輸注可獲得酶分布的改善。

實施例7

於MPS VI患病貓進行重組人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之6個月安全性評比

使用根據本發明之製法製造的酶開始兩項MPS VI貓為期6個月的研究。研究目的係評比患有MPS VI貓之rhASB投射至人類用臨床劑量，每週輸注之安全性及功效。研究6係有關小貓始於3至5月齡投藥。研究7係有關小貓由出生開始投藥，每週輸注投射至rhASB人類用臨床劑量。此等研究意圖評比可能的毒性。於重組酶輸注期間觀察貓之行為改變來了解可能之免疫反應。監視血清是否完全排空，以及監視血清之針對重組酶抗體之生成。一般器官功能係藉完整臨床

化學評審(腎功能及肝功能)、尿液分析以及完整血球計數(CBC)伴以差異血球數目監控。尿液糖胺基聚糖濃度係每週以相對於每輸注之設定時間點監視。記載疾病之臨床改善證據。資料可提供治療可能功效之額外評估，且可評估於活體內酶之活性及吸收。此等研究係以儘可能符合GLP法規原則及規範之方式進行。

第一研究初步結果指出對rhASB並未對任何動物產生不良影響，體重以及臨床化學通常可維持於參考值範圍。但抗體力價顯著升高之兩頭貓於輸注期間皆出現異常臨床徵相，但一旦停止輸注酶則表現正常，且未有任何長期病變影響。延長輸注時間(4小時)以及提高前置抗組織胺藥物，則允許貓接受連續治療而無任何異常臨床徵相。尿液GAG濃度的輕微下降，提示治療對於降低組織或循環之糖胺基聚糖存量略微有效，但隨著時間的經過，此種濃度出現起伏波動，造成解譯上的困難。5頭貓回應於ERT，皆未顯示明顯臨床改善，但基於先前的研究需要至少6個月處理²³。5頭貓中有4頭出現抗體力價，於兩個月ERT之後觀察得力價顯著增高。其中兩頭貓經2或3個月後力價顯著升高。

實施例8

以rhASB處理MPS VI貓之安全性側繪

開始一項研究，招募於出生24小時以內即接受處理之患病貓。41頭MPS VI貓使用rhASB處理。酶投予正常貓限於1至2頭貓，來證實新的一批rhASB之急性安全性，隨後才讓有效數目之患病貓接受治療。要言之，並無任何MPS VI貓

因投藥而死亡，但有4頭貓因病毒感染或因潛在的先天異常死亡。研究用酶係根據本發明方法製造。初步資料列舉於表13。

表13：得自哈普沃(Hopwood)實驗室之MPS VI貓功效研究摘要

研究數目	貓頭數	劑量/週(毫克/公斤)	處方長度(月)	死亡率
1	2	可變	13-21	無
	1			
2	1	0.2	5	無
2	1	0.2	1	死亡：先天性心臟缺陷
-	2	0.5	3-5	1頭死於小病毒(parvovirus)
2	4	1	3-11	1頭死於小病毒
	2			
-	1	1	6 (s.c.)	無
-	4	1	6	無
2	2	5	3-11	1頭死於小病毒
	2			
4	2	0.5(兩次)	5	無
-	3	0.5(兩次)	5	無
5	4	1	1	無
6	5	1	開始	無
7	5	1	開始	無

實施例8A

採用緩慢輸注之組織分布

採行另一項研究來比較使用長時間(2小時)或短時間(10-15分鐘)輸注方案(ASB-PC-004)，用於MPS VI幼貓(開始時小於10週齡)，rhASB之吸收速率及組織分布。數頭正常貓(12-24月齡)以鎮定劑鎮定，植入股動脈套管來採集血樣。1.0毫克/公斤或7.3毫克/公斤劑量之rhASB係經40秒時間以7毫升容積

輸注於腦靜脈。給藥後約2、4、6、8、10、20、30、40、60及120分鐘取得一系列肝素化動脈血樣。離心收集血清，冷凍至分析為止。經4小時後，將貓安樂死，收集組織，秤重，且冷凍直到分析。

另一項分開研究中，3頭正常貓(8-66月齡)以7毫升計量容積接受1.0毫克/公斤靜脈大劑量注射rhASB。給藥後2、4或7日每個時間點將1頭貓安樂死。收集選定的組織、秤重且冷凍至分析。另一頭未暴露於rhASB之正常貓經安樂死來提供組織之貓ASB濃度供分析比較。使用ELISA檢定分析技術定量血漿及組織之rhASB或貓ASB。樣本之rhASB吸附至被制動的抗rhASB單株抗體，貓ASB則吸收至多株抗rhASB抗體(該抗體與貓ASB交互反應)。被吸收之ASB隨後使用非螢光基材定量。

血漿濃度分析顯示rhASB之 $t_{1/2}$ 於1.0毫克/公斤劑量為 13.7 ± 3.2 分鐘，而於7.3毫克/公斤劑量約等於45分鐘。於1.0毫克/公斤劑量後組織 $T_{1/2}$ 於肝、脾、腎及心係於2.4-4.2日之範圍。給藥後長達7日此等組織(心臟除外)出現低的但可偵測之濃度。給予1.0毫克/公斤ASB後4小時，大部分劑量係輸送至肝臟，全部組織且有可偵測之劑量，軟骨及角膜除外，但大部分係於肝臟。大腦及小腦除外，組織濃度比未處理對照貓之貓ASB組織濃度高4倍(主動脈)至495倍(肝臟)。研究測得組織半生期(於1.0毫克/公斤為2.4-4.2日)證實每週臨床給藥頻次。

本研究之主要目的係評比輸注速率、酶分布、組織GAG

存量的清除、以及尿液GAG濃度的下降之影響。多組(每組n=2) 10週齡MPS VI貓投予短時間(10-15分鐘)或長時間(2小時)靜脈輸注rhASB，1.0毫克/公斤劑量每週一次為期5週。末次輸注後2日將貓安樂死，收集特定組織(肝、脾、心、肺、腎、皮膚、主動脈、大腦、小腦、軟骨、角膜及淋巴結)來測定ASB活性以及組織病理評比。組織冷凍儲存至分析時。研究採用前述測定組織ASB之相同免疫檢定分析(ASB-PC-001)。兩小時輸注組有一頭貓之組織酶濃度比其它經處理的貓更低。於末次給藥之後插管部位周圍偵測得酶濃度高，而對側肢體觀察得低濃度。此等發現提示插管過早鬆脫，結果促成該頭貓之組織ASB濃度低。比較其餘3頭貓之酶活性，顯示肝、肺、腎、大腦及小腦之酶活性增高，兩小時輸注貓之腸系膜淋巴結活性比10分鐘輸注貓之活性低。皮膚、軟骨及角膜未觀察得任何酶。雖然本研究之資料有限，但本研究之發現提示2小時輸注比10分鐘輸注可獲得組織酶濃度增高(肝臟除外)，指示延長輸注時間可獲得較佳組織分布。

實施例9

製造及純化方法(灌流法)

比較批次饋料法以及以灌流為主之細胞培養法等純化方法之處理流程圖顯示於表14。與批次饋料純化法之比較、以及灌流純化法材料之特定改變細節摘述於表15。表16說明用於以灌流為主之細胞培養之純化方法。

表 14：批次法與灌流法之純化方法比較



表 15：純化變化之摘要說明

製造步驟	說明(批次)	說明(灌流)
純化方法		
濃縮/ 滲濾	切線流過濾：2.8平方米 白蛋白留存MWCO過濾器 操作： - 濃縮至10倍 - 對5倍容積10 mM磷酸鈉，100 mM氯化鈉，pH 7.3滲濾	改變： 切線流過濾：5.6平方米 白蛋白留存MWCO過濾器 操作： - 濃縮至20倍 - 無滲濾，系統以100 mM磷酸鈉，pH 7.3清洗 理由： - 減少於4°C儲存容積
↓		
DEAE 希法羅司 FF流經 層析術	管柱： 2x30厘米直徑x33厘米高度 - 預洗：0.1 N氫氧化鈉 - 洗滌：注射用水(WFI) - 中和：100 mM磷酸鈉，pH 7.3 - 平衡：10 mM磷酸鈉，100 mM氯化鈉，pH 7.3 - 載荷：經濃縮/經滲濾之收穫物 - 洗滌：10 mM磷酸鈉，100 mM氯化鈉，pH 7.3 - 汽提：10 mM磷酸鈉，1.5 M氯化鈉，pH 7.3 - 再生：10%冰醋酸 - 洗滌：注射用水(WFI) - 消毒：0.5 N氫氧化鈉 - 儲存：0.1 N氫氧化鈉	此步驟刪除
↓		
pH調整及 過濾		pH調整：添加10%冰醋酸至匯集之20倍濃縮物至終pH 5.0

		• 載荷：經匯集之20倍濃縮物 • 通過澄清過濾器及0.2微米過濾器過濾 • 沖洗：20 mM乙酸鈉，120 mM氯化鈉，pH 5.0 理由： • 提高隨後藍希法羅司樹脂管柱之rhASB結合能力
↓		
藍希法羅司FF層析術	管柱： 20厘米直徑x11厘米高度 • 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 中和：1 M乙酸鈉，pH 5.5 • 平衡：20 mM乙酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.5 • 載荷：DEAE流經調整至20 mM乙酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.5 • 洗滌：20 mM乙酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.5 • 洗提：20 mM乙酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 5.5 • 再生：20 mM乙酸鈉，1.0 M氯化鈉，pH 5.5 • 消毒：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌1：注射用水 • 洗滌2：1 M乙酸鈉，pH 5.5 • 儲存：20%乙醇	改變： 管柱： 45厘米直徑x16厘米高度 • 中和：刪除 • 平衡：10 mM磷酸鈉，pH 6.45 • 載荷：經匯集之20倍濃縮物，pH調整至5.0及過濾 • 洗滌：10 mM磷酸鈉，pH 6.45 • 洗提：10 mM磷酸鈉，125 mM 氯化鈉，pH 6.45 • 再生：10 mM磷酸鈉，1.0 M 氯化鈉，pH 6.45 • 洗滌2：10 mM磷酸鈉，1.0 M 氯化鈉，pH 6.45 理由： • 此種條件允許可能之CHO雜質的去除改善，因而可免除DEAE希法羅司層析術。
↓		
銅螯合希法羅司FF層析術	管柱： 14厘米直徑x9厘米高度 • 預洗：0.1 N氫氧化鈉	改變： 管柱： 40厘米直徑x6厘米高度

✓
(3p48)

16 ↑

	• 洗滌：注射用水(WFI) • 進料緩衝液：0.1 M硫酸銅 • 平衡：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 6.0 • 載荷：經由添加20 mM乙酸鈉，500 mM氯化鈉，50%甘油，pH 6.0而調整藍洗提劑之甘油含量至10% • 洗滌1：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 6.0 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 4.0 • 洗滌3：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 3.8 • 洗提：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 3.6 • 再生：50 mM EDTA，1.0 M氯化鈉，pH 8.0 • 消毒：0.5 M氫氧化鈉 • 儲存：0.1 M氫氧化鈉	• 平衡：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 5.5 • 載荷：經由添加20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，50%甘油，pH 5.2而調整藍洗提劑之甘油含量至10% • 洗滌1：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 5.5 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉，10%甘油，pH 3.9 • 洗滌3：刪除 理由： • 使用修改步驟可獲得一致再現性產物純度
↓		
病毒去活化	於使用0.5 M NaOH調整至pH 4.5之前經匯集之洗提分維持30-120分鐘	無改變
↓		
苯基希法羅司層析術	管柱： 10厘米直徑x16厘米高度 • 樹脂：苯基希法羅司高效 • 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 平衡：20 mM乙酸鈉，3.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 載荷：經由添加20 mM乙酸鈉，5 M氯化鈉，pH 4.5而調整	改變： 管柱： 40厘米直徑x16厘米高度 • 樹脂：苯基希法羅司高次快速流 • 平衡：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 載荷：經由添加20 mM乙酸鈉，5 M氯化鈉，pH 4.5而調整

icc
(打p65)

	銅洗提劑之氯化鈉含量至3 M • 洗滌1：20 mM乙酸鈉，3.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，1.6 M氯化鈉，pH 4.5 • 洗提：20 mM乙酸鈉，1 M氯化鈉，pH 4.5 • 再生：20 mM乙酸鈉，pH 4.5 • 消毒：0.5 N氫氧化鈉 • 儲存：0.1 N氫氧化鈉	銅洗提劑之氯化鈉含量至2 M • 洗滌1：10 mM磷酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 7.1 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 洗提：20 mM乙酸鈉，250 mM氯化鈉，pH 4.5 理由： • 交替樹脂對rhASB具有較為有利之流動特性及容量 • 洗滌1可更強力清除可能之蛋白質雜質
↓		
UF/DF終	切線流過濾：<0.4平方米 MWCO 10 kDa過濾器。 • 平衡：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8 • 濃縮：濃縮至NMT 1.5毫克/毫升 • 滲濾：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8	改變： 切線流過濾：2.8平方米 MWCO 10 kDa過濾器。
↓		
去除DNA	未進行	新步驟： • DNA過濾：產品通過以離子交換為主之DNA過濾器過濾 理由： • 額外清除DNA俾補償DEAE流經層析術步驟的刪除。
↓		
調配	• 以10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8稀釋至1.0毫克/毫升	
↓		
過濾病毒	• 病毒過濾：產品通過0.04微	改變：

	米過濾器過濾	- 病毒過濾：產品通過0.02微米過濾器過濾 理由： - 使用較小孔徑來提升病毒的清除
↓		
調配	此步驟出現於處理早期 (於病毒過濾前)	改變： - 以10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8稀釋至1.0毫克/毫升 - 調配：波利索貝80添加至濃度50微克/毫升
↓		
過濾	過濾：稀釋後產物經0.2微米過濾器過濾入儲存容器	無改變

表 16：rhASB純化方法(灌流法)

步驟	方法
收穫過濾	- 經澄清過濾器、0.45微米過濾器及最終0.2微米過濾器過濾 - 過濾後匯集之收穫物儲存於聚丙烯袋內
UF濃縮	- 平衡與沖洗：100 mM磷酸鈉，pH 7.3 - 載荷：經過過濾後之收穫流體 - 濃縮：濃縮至20倍 - 過濾：稀釋後產物經0.2微米過濾器過濾入儲存容器
pH調整及過濾	- pH調整：添加10%冰醋酸至匯集之20倍濃縮物至終pH 5.0 - 載荷：經過匯集之20倍濃縮物 - 清洗：注射用水(WFI) - 經澄清過濾器及0.2微米過濾器過濾 - 沖洗：20 mM乙酸鈉、120 mM氯化鈉，pH 5.0
藍希法羅司6 FF (藍，藍希法羅司)	- 預洗：0.1 N氫氧化鈉 - 洗滌：注射用水(WFI) - 平衡：10 mM磷酸鈉，pH 6.45 - 載荷：pH經調整且經過過濾之匯集的20倍濃縮物 - 洗滌：10 mM磷酸鈉，pH 6.45 - 洗提：10 mM磷酸鈉，125 mM氯化鈉，pH 6.45

	• 再生：10 mM磷酸鈉，1.0 M氯化鈉，pH 6.45 • 消毒：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌1：注射用水(WFI) • 洗滌2：10 mM磷酸鈉，1.0 M氯化鈉，pH 6.45 • 儲存：20%乙醇
螯合希法 羅司FF (銅，CC， 銅-螯合)	• 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 電荷緩衝液：0.1 M硫酸銅 • 平衡：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 5.5 • 載荷：經由添加100 mM乙酸鈉、2.0 M氯化鈉、50%甘油，pH 5.2，調整經過匯集之藍洗提產物之甘油含量至10% • 洗滌1：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 5.5 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 3.9 • 洗提：20 mM乙酸鈉，0.5 M氯化鈉、10%甘油，pH 3.6 • 洗提分維持30-120分鐘隨後以0.5 M NaOH調整至pH 4.5 • 再生：50 mM EDTA，1.0 M氯化鈉，pH 8.0 • 消毒：0.5 M氫氧化鈉 • 儲存：0.1 M氫氧化鈉
苯基希法 羅司6FF高 次 (苯基，苯 基高次)	• 預洗：0.1 N氫氧化鈉 • 洗滌：注射用水(WFI) • 平衡：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 載荷：藉添加20 mM乙酸鈉、5 M氯化鈉，pH 4.5調整銅洗提劑之氯化鈉含量至2 M • 洗滌1：10 mM磷酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 7.1 • 洗滌2：20 mM乙酸鈉，2.0 M氯化鈉，pH 4.5 • 洗提：20 mM乙酸鈉，250 mM氯化鈉，pH 4.5 • 再生：20 mM乙酸鈉，pH 4.5 • 消毒：0.5 N氫氧化鈉 • 儲存：0.1 N氫氧化鈉
UF/DF， DNA過濾 ，病毒過 濾，調配	• 平衡：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8 • 濃縮：濃縮至NMT 1.5毫克/毫升 • 滲濾：10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 5.8 • DNA過濾：產物通過DNA過濾器過濾 • 病毒過濾/稀釋：產物通過0.02微米過濾器過濾且稀釋至1.0

	毫克/毫升 • 調配：添加濃度50微克/毫升之波利索貝80 • 過濾：稀釋後產物通過0.2微米過濾器過濾入儲存容器
--	---

全部純化管柱於使用前皆經過再生，於使用後皆經過消毒，且儲存於表15及16指示之適當緩衝液內。

純化原料

全部材料皆由合格供應商供應。

表 17：純化用原料

成分	等級
冰醋酸	USP
硫酸銅五水合物	USP
EDTA 二鈉	USP
脫水醇，USF(乙醇，200度)	USP
甘油	USP
乙酸鈉，三水合物	USP
氯化鈉	USP
氫氧化鈉 50% w/w 溶液	試藥級
磷酸鈉，二鹼基，七水合物	USP/EP
磷酸鈉，一鹼基，一水合物	USP
鹽酸，6 N 容積溶液	試藥級
波利索貝 80，MF/EP (CRILLE 4 HP)	NF/EP
注射用水，散裝	USP

使用之甘油係衍生自合成方法。全部使用之原料需符合 CPMP/CVMP 指南之最新版本，名稱「最小化經由人類用及動物用藥品傳播動物海綿樣腦病變因子風險」，其中藉激烈方法製造的獸脂衍生物如甘油及脂肪酸被視為不可能傳染，該激烈方法涉及已知對牛海綿樣腦病變(BSE)因子可永久性殺滅之高溫及高壓條件或化學反應。如此，由甘油傳播 BSE 的風險被視為極低。

rhASB之病毒安全性係藉下列組合獲得證實，選擇合格的供應商、原料的測試、細胞存庫、特徵化研究、病毒去除研究及rhASB純化法之病毒去活化能力、以及例行的批次放行試驗。相關US、EU及ICH法規及指南也需參照來確保rhASB之病毒安全性。

管柱層析術，DNA之去除及病毒過濾

現在rhASB使用一系列層析術及過濾步驟純化。收穫之流體藉超濾濃縮至20倍，pH經調整、過濾及載荷至藍希法羅司快速流層析術管柱(45厘米x 16厘米)。藍希法羅司快速流洗提分於載荷至銅螯合希法羅司管柱之前先經過濾。銅洗提分於載荷至苯基希法羅司快速流高次管柱前經過濾。全部三個管柱層析術純化步驟皆係以結合洗提模式進行。苯基希法羅司管柱洗提分通過陰離子交換過濾器及病毒減少過濾器，隨後經濃縮且藉超濾進行緩衝液交換。

病毒之去除/去活化研究

進行兩項研究來評比經修改之rhASB純化法之病毒減少能力。研究係於百歐李蘭斯(BioReliance)(馬里蘭州洛克維)使用兩種模式病毒系統進行，分別為親異種鼠白血病病毒(XMuLV)及鼠微小病毒(MMV)。XMuLV為套膜單股RNA反錄病毒，對物理化學去活化之抗性低。MMV為小型無套膜單股DNA病毒，對物理化學作用劑之抗性高。

此等研究評比用於rhASB純化法之二層析步驟(銅螯合希法羅司FF及苯基希法羅司FF高次)及病毒過濾器(0.02微米)。使用處理步驟規模縮小之版本來進行刺激研究及回收研

究。維持之關鍵參數為滯留時間以及基體-溶液交互作用。經由複製緩衝液、線性流速、及管柱高度但調整管柱直徑而達成。研究使用之材料(產物及緩衝液)係由實際全規模製造收集而得。

層析術管柱(銅螯合希法羅司管柱及苯基希法羅司管柱)經填裝且於出貨至百歐李蘭斯公司之前預先使用典型 rhASB 載荷物流洗(空白組)、或使用含病毒緩衝液之載荷物流洗。於病毒緩衝液存在下的層析圖及產物產率與空白組做比較。相同管柱載荷物恰於層析術之前使用 XMuLV 或 MMV 刺激。各評比步驟之病毒減少量係經由比較管柱載荷之病毒負擔以及洗提分測定。研究結果摘述於表。

表 18：XMuLV 及 MMV 之減少因素

處理步驟	XMuLV 對數降低	MMV 對數降低
藍希法羅司	未試驗	未試驗
銅螯合(+維持低 pH)	$\geq 3.51 \pm 0.52$	$\geq 2.71 \pm 0.52$
苯基希法羅司	$\geq 3.54 \pm 0.36$	$\geq 1.72 \pm 0.64$
DNA 過濾	未試驗	未試驗
病毒過濾	$\geq 5.51 \pm 0.43$	$\geq 4.76 \pm 0.00$
總對數降低	≥ 12.56	≥ 9.19

處理中試驗

處理中試驗係於整個處理過程進行，如圖 3 所示。收穫細胞培養流體及純化中間物之處理中試驗述於表 19 及 20。

表 19：收穫細胞培養流體之處理中試驗

試驗	作用濃度
藉 LAL 之細菌內毒素(USP/EP)	≥ 2 EU/毫升
生物負擔(USP/EP)	≥ 1 cfu/10 mL
藉布拉佛(Bradford)之總蛋白質及活性	結果用於算出藍希法羅司管柱載荷

微漿菌 ¹	陰性(放行規格)
於病毒污染物存在下之試管 內檢定分析 ¹	陰性(放行規格)

¹於製造中細胞培養收穫階段之多個時間點進行採樣。細胞培養結束之前最末移出的樣本經試驗，陰性結果則要求放行該批次。

表 20：純化中間物之處理中試驗

試驗	作用濃度
藉 LAL 之細菌內毒素 (USP/EP)	≥ 3 EU/毫升於管柱洗提分 ¹
生物負擔 (USP/EP)	≥ 20 cfu/mL 預先過濾 ¹ ≥ 1 cfu/100 mL 於經調配之本體藥物 (FBDS) ²
活性	結果用於計算銅螯合管柱及苯基 希法羅司管柱之載荷
藉紫外光-可見光光譜 術測定總蛋白	結果用於計算 UF/DF 之蛋白質濃度

¹結果超過作用濃度則遵照標準操作程序研究。

²若結果超過作用濃度，則 FBDS 通過 0.2 微米過濾器過濾至適當無菌儲存容器內，然後經過隔離檢疫不准放行出貨至填裝位置。

灌流法純化前驅物 rhASB 之結果

表 21 提供使用表 15 及 16 所述純化法獲得 rhASB 純化度資料。「藉 RP-HPLC 之純度」一欄指示對 rhASB 之前驅物形式及成熟形式組合量所得純度。

表 21：rhASB 批次放行結果

批號	藉 RP-HPLC 測得 之純度	加工形式 之存在*	製法
AP60028	99.6	-	批次法

AP60029	98.8	+	批次法
AP60030	98.7	+	批次法
AP60031	99.1	-	批次法
AP60032	99.8	-	批次法
AP60033	99.4	-	批次法
AP60035	98.7	-	批次法
AP60036	99.4	-	批次法
AP60038	99.6	-	批次法
AP60039	99.3	-	批次法
AP60040	99.1	-	批次法
AP60101	99.3	-	批次法
AP60102	98.9	-	批次法
AP60103	99.0	-	批次法
AP60104	99.0	+	批次法
AP60105	99.0	-	批次法
AP60106	99.2	-	批次法
AP60107	99.4	-	批次法
AP60108	99.7	-	灌流法
AP60109	99.8	-	灌流法
AP60201	99.0	N/A	灌流法
AP60202	100	-	灌流法

*「+」指示經調配之本體藥物存在有加工形式(估值1-15%)
;「-」指示不存在有加工形式。

圖 4A-4C 提供灌流純化法之 3 個層析步驟之代表性層析圖 (表 16)。表 22 提供三個層析步驟個別之前驅物 rhASB 平均回收率。圖 5 提供於各個層析步驟之處理中樣本以及純化後終產物(前驅物 rhASB)之純度分析資料。

表 22：純化回收率摘要

步驟	平均回收率(%)
pH調整至 5.0	83
藍希法羅司管柱	84

銅螯合希法羅司管柱	86
銅變遷至苯基	86
苯基希法羅司管柱	88
總計	50

比較使用批次法及灌流法所得純化產物，灌流法明確製造較純之前驅物 rhASB。甚至經由選擇不同洗提分或改變條件，試圖進一步最佳化批次法，仍然無法獲得灌流法所得之一致純產物。灌流法可製造純度 99%或以上之一致前驅物 rhASB，而批次法則否(表 21)。圖 6 提供使用就批次法所得產物(線道 2)與使用灌流法純化所得純化產物(線道 3-9)之比較，較批次法其中細胞培養係使用補充 G418 但未補充葉酸、絲胺酸及天冬醯胺之培養基培養。rhASB 樣本於 SDS 使用還原劑變性，於 SDS 流洗緩衝液內通過 4-20% PAGE 電泳。批次法純化產物比灌流法純化產物明確含有遠較多雜質(特別接近 48 kDa 大小)。批次法 rhASB 出現可偵測量之加工形式(估值 1-15%)(線道 2)。灌流法純化後批次彼此可高度媲美，比批次法純化之 rhASB 標準品顯然較不複雜，指示灌流法產物純度較高。

表 23 提供使用灌流純化法純化所得前驅物 rhASB 之純度百分比。

表 23：終產物純度

批號	藉 RP-HPLC 之純度(%主峰)
AC60109 UF # 4	99.8
AC60109 UF # 10	99.6
AC60109 UF # 1	99.7
AC60109 UF # 18	99.9

AC60109A UF # 22	99.7
AC60109A UF # 25	99.8
AC60109A UF # 27	100
AC60109 BMK 製造	99.8
AC60202 UF # 4	未測定
AC60202 UF # 10	未測定
AC60202 UF # 18	未測定
AC60202 BMK 製造	100
平均	99.8

表 24 提供使用灌流處理純化法除化所得前驅物 rhASB 批次之純度百分比，此處純度係藉 RP-HPLC 及 SEC-HPLC 評比（允許定量不同分子量雜質，例如加工形式或多元體）。

表 24：藉 RP-HPLC 及 SEC-HPLC 之純度

批號	藉 RP-HPLC 純度 (%主峰)	藉 SEC-HPLC 純度 (%主峰)
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

* 未測定

於灌流法之蛋白酶之去除

於 180 升批次規模，每批需要兩次相對大型 24 升 DEAE 希法羅司操作。灌流法產生 10 倍大量之收穫物容積，造成 DEAE 希法羅司之管柱大小過大而不實際，以及實際上大規模純化時緩衝液的容積也過大而不實用。因此去除特別不合理

的 DEAE 希法羅司步驟，試圖流線化新穎灌流純化串列步驟。結果三個管柱串聯(如表 16 所述)可克服此種大規模製造障礙。

批次法(述於表 15)之 DEAE 希法羅司層析術步驟主要係用來去除總蛋白(包括蛋白酶)及 pH 指示劑染料亦即酚紅。後者於新方法係由 302 培養基調配物中去除酚紅而解決。藉 DEAE 希法羅司步驟去除總蛋白，結果導致藍希法羅司於 pH 5.5 之容量增高。新穎方法中，需要識別藍希法羅司條件，來平衡高 rhASB 能力同時限制蛋白酶活性。能力及蛋白質分解於低 pH 皆提升。此外蛋白酶清除需驗證俾改進隨後銅層析術步驟之能力；蛋白酶亦即組織蛋白酶之清除與批次法成問題。發現可獲得期望結果之條件，因此於低 pH 進行載荷，同時於較高 pH 進行洗滌及洗提條件，該條件可有效清除蛋白酶亦即組織蛋白酶，具有 0.8 毫克 rhASB/毫升樹脂之可接受的載荷量。蛋白酶活性(例如組織蛋白酶)之去除可於圖 8 層析圖獲得驗證。

比較由灌流法純化之 rhASB 102PD0055，使用新穎方法(不含 DEAE FT 層析術)或老舊批次純化法(PS 洗提分)(OP)指示由同一反應器操作(使用批次法)純化所得舊式方法材料線道(PS 洗提分)(OP)具有顯著較大蛋白質分解，可由銀染色凝膠的無外帶獲得證實，且可藉抗 ASB 抗體偵測(參考圖 9)。新穎方法比批次標準遠更純。組織蛋白酶藉藍層析術清除。抗組織蛋白酶交互反應性物質出現於使用新穎方法之藍汽提分。

後文實施例 11 所述藥力學結果，顯示較為純質之 rhASB 製劑可獲得比前一批次標準更長的半生期。

實施例 10

界面活性劑對粒子生成的影響

進行實驗方案來測定使用新穎灌流細胞培養法製造之 rhASB 之小瓶中，波利索貝 80 對小瓶中粒子生成的影響。採用視覺檢定分析及粒子計數檢定分析來測定粒子生成程度。此外，進行活性試驗、聚丙烯醯胺凝膠電泳 (PAGE)、免疫墨點及尺寸排除層析術 (SEC)，來證實於波利索貝 80 及/或振搖存在下，相對於未經處理對照組所得產物品質。用 rhASB 批次法之小瓶及塞 (舊法，惠頓 (Wheaton) 5 毫升，2905-B24B/西 S-127 (4401/45)) 也與提議用於灌流衍生物質之小瓶及瓶塞 (新法，惠頓 5 毫升，2905-B8BA/西 S-127 (4432/50)) 做比較。

於 rhASB 通過 0.2 微米過濾器之後，使用 10 毫升拋棄式滴量管裝填小瓶。填裝 2 小瓶分別用於含 rhASB 之試驗。二小瓶用於視覺檢定分析，一小瓶指示粒子數目，另一小瓶保留供其餘檢定分析之用。只填裝一瓶緩衝液對照小瓶/試驗。由於裝配、樣本處理、過濾及填充由少數粒子被導入其中。由視覺分析以及粒子計數分析 (結果顯示於下表 25A-C 及 26A-C)，於第 0、1 及 14 日，於調配藥物之未經振搖小瓶相對於只含緩衝液之對照組，未偵測得任何顯著微粒生成。

於 4°C 振搖 18 小時後，兩瓶中，含 rhASB 於只含緩衝液之調配物 (10 mM 磷酸鈉、150 mM 氯化鈉，pH 5.8)，不含波利索貝，觀察得粒子大增。明顯目測可見小薄片。

粒子計數係使用 HIAC/ROYCO 型號 9703 粒子計數器進行。液體粒子計數器可過篩且計數 2.0 微米至 150 微米範圍之粒子。取三份各少於 5 毫升，置於遮光感應器。第 2 回合及第 3 回合之平均粒子數目報告作為每毫升之粒子數目。基於 HIAC-Royko 對 10 微米粒徑之粒子定量結果，老式小瓶及新式小瓶分別獲得 2069 及 1190 粒子/毫升。於 0.001% 波利索貝 80 存在下，以 21 及 49 粒子/毫升發現粒子數目顯著較低。於 0.005% 波利索貝 80，振搖小瓶與未經振搖小瓶間大致未偵測得任何差異。

於不含波利索貝 80 之舊式小瓶/密封，於振搖後第 1 日至第 14 日，出現粒子數目由 2069/毫升降至 268/毫升出乎意外地下降。目測檢定分析指示於同樣 14 日小瓶有較低數目之小瓶之薄片較大；可能是大型粒子干擾 HIAC-Royko 檢定分析，或老式小瓶促成粒子生成的增加，最終聚結或聚集而成為大型粒子(儘管數目較少)。

進行額外試驗來證實振搖後蛋白質的完好。比活性不變。可檢測蛋白質聚集變化之方法亦即尺寸排除層析術(蛋白質的聚集受到機械攪動影響)顯示大型分子量物種並未增加。為了偵測分解產物，rhASB 之 SDS-PAGE 凝膠接受銀染色、或移轉至硝基纖維素而使用抗 rhASB 抗體吸漬。於任一種樣本皆未偵測得額外帶。

表 25A. 目測檢定分析，第 0 日

		102PD0089-01		緩衝液
小瓶	[波利索貝-80]%	無振搖		無振搖
老	0	(-)	(-)	(-)

老	0.005	(-)	(-)	(-)
老	0.001	(-)	(-)	(-)
新	0	(-)	(-)	(-)
新	0.005	(-)	(-)	(-)
新	0.001	(-)	(-)	(-)

表 25B. 目測檢定分析，第 1 日

		102PD0089-08				緩衝液	
小瓶	[波利索貝-80]%	振搖		無振搖		振搖	無振搖
老	0	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
老	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
老	0.001	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
新	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新	0.001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

表 25C. 目測檢定分析，第 14 日

		102PD0089-01				緩衝液	
小瓶	[波利索貝-80]%	振搖		無振搖		振搖	無振搖
老	0	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
老	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
老	0.001	(+/-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
新	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
新	0.005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
新	0.001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

目測檢定分析：

無可目測沈澱	+
邊緣，未確定觀察	-/+
小量細小沈澱	+
顯著沈澱，混濁	++
極為混濁，大片沈澱	+++

表 26A. 微粒分析，HIAC-Royko(粒子/毫升)，第 0 日

		102PD0089-01		緩衝液	
小瓶	[波利索貝-80]%	無振搖		無振搖	
		10微米	25微米	10微米	25微米
老	0	4.5	0.5	2.5	0.0
老	0.005	2.0	0.5	1.5	0.0
老	0.001	4.5	1.5	2.5	1.0
新	0	6.5	2.5	6.0	4.0
新	0.005	1.5	0.5	3.0	1.0
新	0.001	19.5	5.0	2.0	0.0

表 26B. 微粒分析，HIAC-Royko(粒子/毫升)，第 1 日

		102PD0089-01				緩衝液			
小瓶	[波利索貝-80]%	振搖		無振搖		振搖		無振搖	
		10 微米	25 微米	10 微米	25 微米	10 微米	25 微米	10 微米	25 微米
老	0	2069.0	74.5	3.0	0.5	0.5	0.5	2.5	2.0
老	0.005	3.5	0.0	2.0	0.5	3.5	2.5	1.0	0.5
老	0.001	21.5	2.5	2.0	1.0	2.5	1.0	1.5	1.5
新	0	1190.0	34.5	5.0	0.5	0.0	0.5	2.5	3.5
新	0.005	19.0	0.0	4.5	0.0	2.5	0.0	17.0	0.0
新	0.001	49.0	0.5	9.0	2.5	9.5	0.5	6.0	1.0

表 26C. 微粒分析，HIAC-Royko(粒子/毫升)，第 14 日

		102PD0089-01				緩衝液			
小瓶	[波利索貝-80]%	振搖		無振搖		振搖		無振搖	
		10 微米	25 微米	10 微米	25 微米	10 微米	25 微米	10 微米	25 微米
老	0	268.0	18.0	0.5	0.0	4.5	2.0	0.0	0.5
老	0.005	2.0	2.5	1.0	1.0	2.5	0.5	6.0	3.0
老	0.001	72.0	6.5	7.0	3.0	7.0	1.0	1.0	2.0
新	0	1335.0	29.0	2.0	0.0	1.5	0.0	1.5	0.5

新	0.005	7.0	0.5	16.0	0.0	13.5	0.0	13.0	2.0
新	0.001	38.0	1.5	5.5	0.5	16.0	0.5	8.0	0.0

結果指示無論如何形成，人工填裝程序極少產生粒子。於 180 rpm 恆定激烈振搖之後，不含波利索貝 80 調配之含 rhASB 小瓶明顯觀察得粒子。

存在有波利索貝 80 可高度有效抑制機械誘生粒子的生成。保護效果明顯，於含 0.001% 及 0.005% 波利索貝 80 之振搖小瓶，粒子數目大致降至等於背景值。0.005% 波利索貝 80 濃度減少粒子數目比 0.001% 波利索貝 80 濃度效果略微改善。

由活性、蛋白質濃度、純度或凝聚百分比評比，並未觀察得振搖或調配造成任何產物的不穩定。

實施例 11

人體臨床研究

患有黏多醣病 VI (MPS VI) 亦即馬洛投-拉米症候群病人之重組人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (rhASB) 之 1/2 期隨機雙盲式臨床試驗，係使用根據此處所述批次法製造之藥物產品進行。rhASB 係調配成濃度 1 毫克/毫升，pH 5.8，9 mM 一鹼基磷酸鈉·1 H₂O，1 mM 二鹼基磷酸鈉·7 H₂O，150 mM 氯化鈉。投予病人時，經由將適量藥物溶液稀釋於室溫含生理食鹽水之靜脈注射 (IV) 袋製備。全部病人於輸注前接受抗組織胺之前置用藥來減少輸注可能引起的反應。

本研究目的係評比兩種劑量 rhASB 於患有 MPS VI 病人作為 ERT 之安全性、功效及藥力學側繪。病人以雙盲式隨機分組成為二劑量組，亦即 0.2 及 1.0 毫克/公斤。藥物係每週一次以 4 小時靜脈輸注投藥。安全性測定包括完整化學評審、

尿液分析、完整血球計數(CBC)包括區別計數以及追蹤AEs。對全部病人皆評估免疫反應及輸注相關反應、補體活化以及抗體之生成。功效參數包括運動耐受性/耐力(6-分鐘走路試驗)、呼吸能力(肺功能試驗)、關節活動範圍(JROM)、功能狀態(兒童健康評估問卷[CHAQ])、尿液GAGs含量以及肝腫大變化、視銳度、心臟功能及睡眠絕息。

於第1、2、12、24週進行藥力學評估，隨後定期進行藥力學評估來測定輸注中及輸注後之抗原(酶)濃度。當病人於第84週開始改成調配物中含0.005%波利索貝80之新灌流法純化rhASB時，於開放標籤延長研究之第83、84及96週也進行藥力學評比。

共招募7位病人，含括之病人包括具有符合疾病快速惡化或中度惡化特徵範圍。一位病人於第3週時因個人因素退出研究且以另一病人遞補。其餘6位病人於完成24週處理後進行預先規定的中期分析。第24週中期分析資料顯示rhASB之耐受性良好，1.0毫克/公斤劑量顯然可產生較高臨床效果，且具有可媲美0.2毫克/公斤劑量之安全性。

低劑量組病人繼續接受1.0毫克/公斤劑量的處理。兩位病人於第48週後(第59及69週)開始接受較高劑量處理。經過96週處理病人已經接受大部分規劃的rhASB輸注。此段期間並無任何病人錯過兩次以上的輸注。

於開始24週處理、然後於48週處理進行之安全性評比，顯示每週接受0.2或1.0毫克/公斤rhASB處理之耐受性良好，二劑量組並無顯著差異。長期接受1.0毫克/公斤處理(經96

週)也顯示耐受性良好。

抗 rhASB 抗體發展濃度及補體濃度

全部接受研究藥物之6位病人於第30週皆出現抗 rhASB 抗體。6位病人中的4位抗體濃度維持相對低，至60週已經由尖峰濃度下降。出現比另外4位病人更高抗體濃度之二病人中，一病人之抗體濃度於第24週由尖峰濃度下降，另一病人之濃度於第60週由尖峰濃度快速下降。96週處理期間 CH50、C3 或 C4 補體濃度未見一致改變。數位病人之 CH50 濃度有中等的間歇下降；但低濃度與輸注關聯症狀間並無補體耗用證據或此等低濃度與輸注相關症狀間之交互關聯證據。圖 10 顯示經 96 週處理之抗體濃度。

尿液糖胺基聚糖

尿液 GAGs 濃度是 MPS 病人之溶小體存量程度的生化標記。至第24週，高劑量組之尿液 GAGs 平均降低70%，相較於低劑量組之55%。DS (MPS VI之主要儲存產物)百分比也類似下降分別為44%及18%。檢查尿液 GAGs 排泄隨著處理週數之函數變化之時程，顯示於高劑量組之第6週，總尿液 GAGs 下降更明顯。資料證實於尿液 GAGs 及 DS 二者，高劑量組顯示較大改變。二處理組之其餘留在研究中的病人通過96週之後，尿液 GAGs 持續下降。圖 11 顯示經 96 週總尿液 GAGs 濃度之下降，圖 12 顯示於第96週從尿液 GAGs 濃度與該年齡適當正常濃度之比較。注意0.2毫克/公斤劑量組仍然留在研究中的兩位病人亦即41號及45號病人分別於第69週及59週轉成1.0毫克/公斤劑量組。第96週時，二病人之GAGs由篩檢的

85%及63%下降。1.0毫克/公斤病人經過整個96週也有類似的降低。第42、43及44號病人分別比篩檢降64%、77%及86%。兩組病人具有較高基準線GAG濃度之降低百分比比GAG濃度較為接近正常範圍(小於5倍正常範圍上限，亦即平均+2標準差)病人更高。

耐力

6分鐘走路試驗作為主要臨床耐力測量。兩位病人於基準線無法走路超過100米，隨機接受1.0毫克/公斤研究藥物(43號及44號)，至第24週時總行走距離顯著改善。全部病人(44號病人除外，44號病人出現C1-C2脊索壓迫)至第48週及96週行走距離改善。圖13顯示6分鐘走路試驗相對於96週處理結果。

其它功效測量

96週研究藥物處理期間，觀察到其它功效參數之中等改善。肩ROM特別屈曲於第24週評估時6位研究病人有5位改善。4位病人中的3位(41、43及45號病人)於第96週評比時仍然持續顯示肩屈曲的改善。4位病人中的3位於第96週時，呼吸功能、強迫活命容量(FVC)以及1秒強迫呼氣容積(FEV1)之測量值仍然改善。6位招募病人中有4位可測量視銳度，4位病人中有3位之視銳度改善超過一線或多線，但有個病人於此段期間之眼鏡度數需重配。藉電腦斷層掃描測量肝腫大(但非此病之主要特徵)也中等下降，特別基準線時肝臟較大病人之肝腫大下降較明顯。

其餘功效參數之改變微小，包括藉ECG測心臟功能、抓

握以及掐緊強度、CHAQ問卷身高及體重、骨礦物質密度以及睡眠研究。經96週時間任一種參數皆未見顯著惡化。

藥力學

於雙盲式研究之第1、2、12及24週以及開放標籤延長研究之第83、84及96週期間進行藥力學評估。始於第84週，病人開始接受實施例9所述灌流法製造之rhASB。

輸注期間於0、15、30、60、90及180分鐘、240分鐘輸注結束時、以及輸注後於5、10、15、30、45、60、90、120及240分鐘，採集血樣。rhASB之藥力學參數係使用非隔間法評估。血漿濃度-時間曲線至無限大以及第一瞬間之面積，使用線性梯形法至最末時間點，以高於定量限度之濃度計算。

對接受0.2毫克/公斤/週病人，第1至24週之 AUC_{0-t} 平均值相當一致($10,009 \pm 5,107$ 於第1週， $11,232 \pm 3,914$ 於第2週， $13,812 \pm 9,230$ 於第12週，以及 $13,812 \pm 9,230$ 於第24週)。對接受1.0毫克/公斤/週劑量病人，AUC平均值為 $94,476 \pm 13,875$ 於第1週， $1,180,909 \pm 46,377$ 於第2週， $157,890 \pm 45,386$ 於第12週以及 $251,907 \pm 201,747$ 於第24週。對此1.0毫克/公斤/週組， AUC_{0-1} 及 AUC_{∞} 之數值增高以及大標準差的原因是因單一病人且AUCs比該組中其它2位病人高約兩倍。

比較0.2及1.0毫克/公斤/週兩組病人之 AUC_{0-t} 平均值，顯示增加遠超過劑量增加的5倍，顯示於此劑量範圍，rhASB之藥力學非呈線性。

第83、84及96週之藥力學參數顯示於下表27。

表 27

參數	第 83 週	第 84 週	第 96 週
C _{max} (奈克/毫升)	1,143 ± 284	1,367 ± 262	1,341 ± 523
T _{max} (分鐘)	180	120	121
AUC _{0-t} (分鐘-奈克/毫升)	172,423 ± 49,495	213,713 ± 45,794	200,116 ± 76,506
AUC _∞ (分鐘-奈克/毫升)	173,570 ± 49,969	215,383 ± 47,018	201,157 ± 77,248
CL(毫升/分鐘/公斤)	6.23 ± 2.10	4.81 ± 0.99	5.54 ± 2.09
V _z (毫升/公斤)	67.6 ± 22.0	122 ± 60.2	123 ± 17.4
V _{ss} (毫升/公斤)	266 ± 52.3	236 ± 21.1	233 ± 27.6
t _{1/2} (分鐘)，半生期	8.49 ± 4.68	19.0 ± 13.2	17.3 ± 8.26
MRT(分鐘)	44.4 ± 7.61	50.9 ± 12.9	46.1 ± 16.1

報告算術平均及標準差，T_{max}除外，T_{max}為中間值。若 n < 3，則報告個別病人之數值。

83週之參數可媲美第2至24週所得參數(一位具有高AUCs之病人除外)，指示每週暴露約經18個月後，rhASB之藥力學的一致性。第83週至第84週，平均AUC值之趨勢向上約25%，總身體廓清率之趨勢向下約25%。由第83週至第84週，半生期由約8.5分鐘延長至17-19分鐘。第96週之參數可媲美第84週之參數。但此藥力學資料係來自於少數病人，個別數值實質上重疊，此等結果指示由實施例9所述修改方法獲得之rhASB高純度製劑具有比原先rhASB製劑更長的半生期。

實施例 12

用於人體之進一步臨床研究

使用根據實施例 9 所述新穎灌流法製備之藥物進行患有黏多糖病 VI (MPS VI) 亦即馬洛投-拉米症候群病人之重組人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (rhASB) 之第 2 期開放標籤臨床研究。rhASB 調配成 1 毫克/毫升，pH 5.8，9 mM 磷酸鈉，一鹼基·1 H₂O，1 mM 磷酸鈉，二鹼基·7 H₂O，150 mM 氯化鈉，0.005% 波利索貝 80。

本研究目的係評估每週靜脈輸注 1.0 毫克/公斤 rhASB 之安全性、功效及藥力學。本研究之含括標準修改成包括耐力受損相對均勻的一組病人。病人於基準線時，於 12 分鐘走路試驗的頭 6 分鐘至少可走 1 米但不超過 250 米。其它含括標準及排除標準類似 1/2 期研究病人，病人至少 5 歲，且記錄經過生化及基因診斷。除了走路試驗外，本研究也含括先前未曾於 MPS 病人研究的多項終點。

安全性之測量包括臨床實驗室評比、尿液分析、CBC 以及區別分析 ECG 及 AEs 之最終。對全部病人也評估輸注相關反應以及補體消耗及抗體之生成。功效參數包括測量耐力及活動性，包括 12 分鐘走路試驗、擴大計時起身行走試驗、3 分鐘爬樓梯試驗以及肉體活動。使用問卷來評估主觀效果(例如關節的疼痛以及關節僵硬)，也評估丹佛發育量表中的其它測量值，例如會繫鞋帶、摸頭頂、穿脫套頭衣、以及撿硬幣且放置杯內等發育時間。其它功能測量包括測量視銳度、骨密度研究、評比夾取及掐緊強度、肩膀 ROM

、功能狀態、肺功能、尿液GAG排泄、視力檢查、心臟功能以及睡眠中血氧飽和度。藥力學評估係於輸注時之第1、2、12及24週進行來測量輸注中及輸注後之抗原(酶)濃度。共招募10位病人，5位在美國，5位在澳洲。全部病人皆完成24週處理。並無任何病人死亡或中斷。全部病人皆接受24次研究藥物輸注；因此全部病人皆涵括於安全性與功效分析。

如同1/2期研究，招募於第2期研究的MPS VI病人之疾病嚴重程度有寬廣變化。數位病人也有疾病之神經學特徵，包括連通性水腦症、頸椎不穩以及椎間盤病。

臨床檢驗評估

此等病人經24週時間皆未觀察得臨床顯著檢驗異常。

抗rhASB抗體及補體研究

10位病人中有8位至第24週已經發展出抗rhASB抗體。其中三位病人發展出抗體濃度比其它病人更高，兩位病人的抗體濃度於24週後仍然持續升高，但顯然於第48週時穩定。此二病人具有「無效」基因型，或於推定ASB主要抗原位置有突變。此二病人比其它病人，尿液GAGs的下降較少。圖14顯示經48週治療之抗體濃度。

於第24週，一位病人於12週輸注前及12週輸注後之C4及CH50值降低，被研究學者視為臨床顯著。C4及CH50略低於輸注前正常值下限，而於輸注後大減。雖然此等結果提示可能有補體消耗，但未觀察得任何臨床徵相或臨床症狀與此種補體消耗符合。研究中的任何其它病人皆未觀察得補

體濃度有臨床顯著異常。

尿液糖胺基聚糖

尿液 GAG 濃度的平均下降迅速，第 6 週時達到最低點，第 6 週至第 24 週維持相對穩定。至第 24 週，尿液 GAGs 平均降低 71%，至第 48 週尿液 GAGs 平均降低 76%。全部病人之尿液 GAG 濃度皆下降，趨近於治療 24 週後的正常範圍。此等資料符合 1/2 期研究中 7 位病人所得結果。圖 15 顯示於 48 週時總尿液 GAG 濃度為下降，圖 16 顯示第 48 週濃度與年齡適當正常濃度的比較。

耐力之測量

對全部病人於基準線以及於隨後每 6 週做 12 分鐘走路試驗評估走路距離。走路距離係以每次評估時兩次分開測量值的平均值記錄，係於 6 分鐘以及 12 分鐘時測定。

於基準線，於 6 分鐘及 12 分鐘平均走路距離分別為 152.4 (± 75.0) 及 264.0 (± 161.7) 米。第 24 週時，6 分鐘之走路距離改善 57.3 (± 59.0) 米 (每位病人 62%)，12 分鐘走路距離平均改進 155 米 (每位病人 98%)。全部病人於 12 分鐘時走路距離皆改善，只有一位病人於頭 6 分鐘走路改善。於 48 週時，12 分鐘走路距離的平均改善為 212 米 (每位病人 138%)。圖 17 顯示 48 週後 12 分鐘走路試驗結果的改善。

3 分鐘爬樓梯試驗是耐力試驗的第二測量值。於基準線，病人平均可爬 50.3 (± 29.5) 梯階。至第 24 週平均可爬的梯階增至 98.1 (± 62.5) 階梯，改善 48 階或每位病人 110% ($\pm 116\%$)。至第 48 週時，平均爬的階梯數目已經增加 61 階，增加至總數

111階，每位病人改善147%。圖18顯示48週之3分鐘爬樓梯試驗結果。爬行階梯數目有重大改變，基準線的表現不一定與第24週時的改善程度有交互關聯。

其它功效測量

本研究之頭24週期間也評估多種其它功效參數。擴大計時起身及行走試驗用來測量一般性功能。整體言之，基準線與24週之間本試驗所需要的總時間並無顯著變化，但至第48週時有中度改善。圖19顯示經48週治療期之擴大計時起身及行走試驗結果。

強制呼氣時間(FET)、FVC及FEV₁係用來評估肺功能。下表28顯示於基準線、第24週及第48週之肺功能值，也顯示第48週時升高及器官腫大的改變。此等參數於24週時未見顯著變化。於48週時，5/10病人之FVC及FEV₁改進，其中的3/5顯示改善，但生長改變小於2%。於第48週強制呼氣時間(>1秒)也平均改進43%。

表 28
肺功能相對於生長及器官腫大

病人	年齡	基準線 身高 (厘米)	基準線 FVC (升)	第 24 週 FVC	第 48 週 FVC ¹	變化的改 身高的 (厘米) (%)	%△第 48 週 肝臟 ²	相對 % △肝 第 48 週	%△脾 第 48 週 ³	相對 %△脾 第 48 週
200	18	96.2	0.47	0.44	0.48	-0.05 (<1)	-6.3	-15.2*	-5.88	-13.90
201	9	93.2	0.52	0.54	0.60	6.65 (7.1)	-2.3	-14.4*	-8.82	-20.17
202	17	120	0.75	ND	0.92	0.55 (<1)	-6.7	-5.3	-27.81	-26.69
203	15	107	0.28	0.27	0.38	1.9 (1.8)	-8.6	-12.5	-16.45	-20.22
204	7	87	0.52	0.60	0.50	3.8 (4.4)	-1.3	-4.5	-6.74	-9.71
300	22	102.4	0.37	0.39	0.37	2.5 (2.4)	-15.5	-20*	-16.58	-21.09
301	9	121.1	1.40	1.46	1.55	4.9 (4.0)	+26.3	+3	19.67	-2.56
302	6	99.7	0.81	0.85	0.83	4.8 (4.8)	+5.7	-13	-1.92	-19.99
303	8	84.6	0.16	0.27	0.31	1.1 (1.3)	-5.8	-13+	-45.33	-49.38
304	16	124.7	0.83	0.74	0.83	1.3 (1.0)	-2.8	-15*	6.93	-6.03

¹粗體字表示臨床上有意義之增高的 FVC 值

²平均肝臟大小之基準線值 681.6 ± 118 cc

³平均脾臟大小之基準線值 146.8 ± 40 cc

*肝臟容積高於於基準線相對於年齡調整為體重之 95% 限度，而至第 48 週時係於正常限度之內

+肝臟容積高於於基準線以及於 48 週時相對於年齡調整為體重之 95% 限度

表 29

肩活動範圍			
肩活動	基準線	於24週之改變 (功能程度)	於48週之 改變
全部病人(n=10)			
主動屈曲	102	6	3
被動屈曲	116	4	(1)
主動伸展	52	5	5
被動伸展	63	9	(6)
主動外轉	59	7	6
被動外轉	69	9	(6)
基線屈曲<90度 病人(n=3)			
主動屈曲	85	9	5
主動伸展	50	6	4
主動外轉	52	7	7

表 X2

肩 ROM(屈曲、伸展、旋轉)係以主動及被動做評估。整組病人之主動 ROM 及被動 ROM 皆觀察得中等增加百分比；但某些病人於 24 週之某些測量值下降。於 48 週時，由於若干因素而有重大變異；但特別於基準線時肩屈曲小於 90 度之病人的肩 ROM 仍然持續改善。上表 29 顯示於基準線、24 週及 48 週時肩膀活動範圍度數。

疼痛及僵硬係使用問卷評估。雖然兩位病人的疼痛分數不變，但 7 位病人至第 24 週時疼痛改善(一位病人未做基準線評估)。全部 9 位病人於第 24 週時皆顯示僵硬改善。使用問卷評估的疼痛及僵硬至第 48 週時仍持續改善。經歷 48 週處理時間，關節疼痛問卷及關節僵硬問卷結果分別顯示於

圖 20 及 21。

全組病人的抓握強度皆顯著改善。7位病人之單手或雙手抓握強度改善。24週時間捏緊試驗極少有變化。其它生活品質評估也極少顯著改變，但於第48週，靈巧及感覺(藉硬幣拾取試驗測量)有中等改善。

活動程度係使用附接皮帶之艾提崔(ActiTrac®)裝置測定。未見活動程度有顯著改變。

心臟功能評比(ECGs)或站立高度及平躺長度未觀察得顯著改變。對一小組病人進行睡眠研究，未顯示臨床顯著改變。

雖然已經參照目前較佳具體實施例說明本發明，但須了解可未悖離本發明之精髓做出多種修改。如此本發明僅受隨附之申請專利範圍所限。

【圖式簡單說明】

圖 1 提供根據本發明人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之製造方法之流程圖。

圖 2 提供根據批次處理法(表 14)人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之純化方法之流程圖。

圖 3 提供根據灌流處理法(表 14 及 15)人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(ASB)之純化方法之流程圖。

圖 4A-4C 說明藍希法羅司管柱(圖 4A)，銅螯合希法羅司管柱(圖 4B)及苯基希法羅司管柱(圖 4C)之層析圖所得結果。

圖 5 顯示 4-20%聚丙烯醯胺梯度凝膠，顯示灌流處理純化法之銀染色 SDS-PAGE 之結果(表 14 及 15)。

圖 6A-6F 說明下列樣本於 4-20% 聚丙烯醯胺梯度 SDS 凝膠之結果：線道 1，NEB 寬廣範圍預先染色分子量標準品 (MW 以 kDa 表示)；線道 2，5 微克 ASB 得自批次 AS60001 (老式批次法)；線道 3，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF4 (灌流法)；線道 4，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF10 (灌流法)；線道 5，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF15 (灌流法)；線道 6，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF18 (灌流法)；線道 7，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF22 (灌流法)；線道 8，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF25 (灌流法)；以及線道 9，5 微克 ASB 得自批次 AP60109 UF27 (灌流法)。凝膠係使用庫馬希-250 染色或銀染色。

圖 7A 顯示於經過銀染色之 4-20% 聚丙烯醯胺梯度 SDS 凝膠之結果。圖 7B 說明於經過庫馬希染色之 4-20% 聚丙烯醯胺梯度 SDS 凝膠之結果。線道 1，批次 AP60202 UF4；線道 2，批次 AP60202 UF10；線道 3，批次 AP60202 UF18；線道 4，批次 AP60202 (BMK)；線道 5，批次 102PD0139x B3；線道 6，批次 102PD0139x B5；線道 7，灌流參考標準品 rhASB-202-002；線道 8，批次 102PD0139 P1；線道 9，批次 102PD0139 P2；以及線道 10，記號 12 標準品 (MW 以 kDa 表示)。

圖 8A-8C 說明對藍希法羅司管柱 (圖 8A)、銅螯合希法羅司管柱 (圖 8B) 及苯基希法羅司管柱 (圖 8C) 所得側繪圖。圖 8B 中，組織蛋白酶活性以紅線表示。

圖 9A 顯示經過銀染色之 4-20% 聚丙烯醯胺梯度 SDS 凝膠結果。圖 9B 顯示由圖 9A 凝膠移轉至硝基纖維素之蛋白質，藉抗 rhASB 抗體探測結果。圖 9C 顯示由圖 9A 凝膠移轉至硝基纖

維素之蛋白質，藉抗組織蛋白酶抗體探測結果。BioLabPreStain指示分子量標準品(MW以kDa表示)。

圖 10 顯示於人體 1/2 期臨床研究，經 96 週使用 rhASB 處理之血清抗 ASB 抗體濃度。

圖 11 顯示於人體 1/2 期臨床研究，經 96 週使用 rhASB 處理之總尿液 GAG 濃度下降。

圖 12 顯示人體使用 rhASB 處理於 96 週之尿液 GAG 濃度與該年齡適當正常濃度之比較。

圖 13 顯示於人體 1/2 期臨床研究，經 96 週使用 rhASB 處理之 6 分鐘行走試驗結果之改進。

圖 14 顯示於人體第 2 期臨床研究，經 48 週處理之血清抗 ASB 抗體濃度。

圖 15 顯示於人體第 2 期臨床研究，經 48 週處理之總尿液 GAG 濃度的下降。

圖 16 顯示人體接受 rhASB 處理於第 48 週之濃度與年齡適當正常濃度之比較。

圖 17 顯示於人體第 2 期臨床研究，經 48 週處理，12 分鐘行走試驗結果的改進。

圖 18 顯示於人體第 2 期臨床研究，經 48 週處理，3 分鐘爬樓梯結果的改進。

圖 19 顯示於人體第 2 期臨床研究，經 48 週處理，擴大起身與行走試驗結果。

圖 20 及 21 分別顯示於人體第 2 期臨床研究經 48 週處理之關節疼痛問卷及關節僵硬問卷結果。

序列表

<110> BIOMARIN PHARMACEUTICAL, INC.

<120> 前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，利用該酶之治療方法及製造及純化該酶之方法

<130> 30610/30011A

<140> 0902131341

<141> 2003-11-07

<150> US 10/290,908

<151> 2002-11-07

<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1656

<212> DNA

<213> 人種

<220>

<221> CDS

<222> (45)..(1643)

<400> 1

```

tagctacagt cggaaacat cagcaagcag gtcattgttc caac atg ggt ccg cgc      56
                                     Met Gly Pro Arg
                                     1

ggc gcg gcg agc ttg ccc cga ggc ccc gga cct cgg cgg ctg ctc ctc      104
Gly Ala Ala Ser Leu Pro Arg Gly Pro Gly Pro Arg Arg Leu Leu Leu
5          10          15          20

ccc gtc gtc ctc ccg ctg ctg ctg ctg ctg ttg ttg gcg ccg ccg ggc      152
Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Pro Pro Gly
25          30          35

tgg ggc gcc ggg gcc agc cgg ccg ccc cac ctg gtc ttc ttg ctg gca      200
Ser Gly Ala Gln Ala Ser Arg Pro Pro His Leu Val Phe Leu Leu Ala
40          45          50

gac gac cta ggc tgg aac gac gtc ggc ttc cac ggc tcc cgc atc cgc      248
Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asp Val Gly Phe His Gly Ser Arg Ile Arg
55          60          65

acg ccg cac ctg gac gcg ctg gcg gcc ggc ggg gtg ctc ctg gac aac      296
Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Asp Asn
70          75          80

tac tac acg cag ccg ctg tgc acg ccg tgg cgg agc cag ctg ctc act      344
Tyr Tyr Thr Gln Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ser Gln Leu Leu Thr
85          90          95          100

ggc cgc tac cag atc cgt aca ggt tta cag cac caa ata atc tgg ccc      392
Gly Arg Tyr Gln Ile Arg Thr Gly Leu Gln His Gln Ile Ile Trp Pro
105          110          115

tgt cag ccc agc tgt gtt cct ctg gat gaa aaa ctc ctg ccc cag ctc      440
Cys Gln Pro Ser Cys Val Pro Leu Asp Glu Lys Leu Leu Pro Gln Leu
120          125          130

cta aaa gaa gca ggt tat act acc cat atg gtc gga aaa tgg cac ctg      488

```


Leu Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Thr His Met Val Gly Lys Trp His Leu	
135 140 145	
gga atg tac cgg aaa gaa tgc ctt cca acc cgc cga gga ttt gat acc	536
Gly Met Tyr Arg Lys Glu Cys Leu Pro Thr Arg Arg Gly Phe Asp Thr	
150 155 160	
tac ttt gga tat ctc ctg ggc agt gaa gat tat tat tcc cat gaa cgc	584
Tyr Phe Gly Tyr Leu Leu Gly Ser Glu Asp Tyr Tyr Ser His Glu Arg	
165 170 175 180	
tgt aca tta att gac gct ctg aat gtc aca cga tgt gct ctt gat ttt	632
Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Asn Val Thr Arg Cys Ala Leu Asp Phe	
185 190 195	
cga gat ggc gaa gaa gtt gca aca gga tat aaa aat atg tat tca aca	680
Arg Asp Gly Glu Glu Val Ala Thr Gly Tyr Lys Asn Met Tyr Ser Thr	
200 205 210	
aac ata ttc acc aaa agg gct ata gcc ctc ata act aac cat cca cca	728
Asn Ile Phe Thr Lys Arg Ala Ile Ala Leu Ile Thr Asn His Pro Pro	
215 220 225	
gag aag cct ctg ttt ctc tac ctt gct ctc cag tct gtg cat gag ccc	776
Glu Lys Pro Leu Phe Leu Tyr Leu Ala Leu Gln Ser Val His Glu Pro	
230 235 240	
ctt cag gtc cct gag gaa tac ttg aag cca tat gac ttt atc caa gac	824
Leu Gln Val Pro Glu Glu Tyr Leu Lys Pro Tyr Asp Phe Ile Gln Asp	
245 250 255 260	
aag aac agg cat cac tat gca gga atg gtg tcc ctt atg gat gaa gca	872
Lys Asn Arg His His Tyr Ala Gly Met Val Ser Leu Met Asp Glu Ala	
265 270 275	
gta gga aat gtc act gca gct tta aaa agc agt ggg ctc tgg aac aac	920
Val Gly Asn Val Thr Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly Leu Trp Asn Asn	
280 285 290	
acg gtg ttc atc ttt tct aca gat aac gga ggg cag act ttg gca ggg	968
Thr Val Phe Ile Phe Ser Thr Asp Asn Gly Gly Gln Thr Leu Ala Gly	
295 300 305	
ggc aat aac tgg ccc ctt cga gga aga aaa tgg agc ctg tgg gaa gga	1016
Gly Asn Asn Trp Pro Leu Arg Gly Arg Lys Trp Ser Leu Trp Glu Gly	
310 315 320	
ggc gtc cga ggg gtg ggc ttt gtg gca agc ccc ctg ctg aag cag aag	1064
Gly Val Arg Gly Val Gly Phe Val Ala Ser Pro Leu Leu Lys Gln Lys	
325 330 335 340	
ggc gtg aag aac cgg gag ctc atc cac atc tct gac tgg ctg cca aca	1112
Gly Val Lys Asn Arg Glu Leu Ile His Ile Ser Asp Trp Leu Pro Thr	
345 350 355	
ctc gtg aag ctg gcc agg gga cac acc aat ggc aca aag cct ctg gat	1160
Leu Val Lys Leu Ala Arg Gly His Thr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Asp	
360 365 370	
ggc ttc gac gtg tgg aaa acc atc agt gaa gga agc cca tcc ccc aga	1208
Gly Phe Asp Val Trp Lys Thr Ile Ser Glu Gly Ser Pro Ser Pro Arg	
375 380 385	

att gag ctg ctg cat aat att gac cca aac ttc gtg gac tct tca ccg 1256
 Ile Glu Leu Leu His Asn Ile Asp Pro Asn Phe Val Asp Ser Ser Pro
 390 395 400

tgt ccc agg aac agc atg gct cca gca aag gat gac tct tct ctt cca 1304
 Cys Pro Arg Asn Ser Met Ala Pro Ala Lys Asp Asp Ser Ser Leu Pro
 405 410 415 420

gaa tat tca gcc ttt aac aca tct gtc cat gct gca att aga cat gga 1352
 Glu Tyr Ser Ala Phe Asn Thr Ser Val His Ala Ala Ile Arg His Gly
 425 430 435

aat tgg aaa ctc ctc acg ggc tac cca ggc tgt ggt tac tgg ttc cct 1400
 Asn Trp Lys Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Cys Gly Tyr Trp Phe Pro
 440 445 450

cca ccg tct caa tac aat gtt tct gag ata ccc tca tca gac cca cca 1448
 Pro Pro Ser Gln Tyr Asn Val Ser Glu Ile Pro Ser Ser Asp Pro Pro
 455 460 465

acc aag acc ctc tgg ctc ttt gat att gat cgg gac cct gaa gaa aga 1496
 Thr Lys Thr Leu Trp Leu Phe Asp Ile Asp Arg Asp Pro Glu Glu Arg
 470 475 480

cat gac ctg tcc aga gaa tat cct cac atc gtc aca aag ctc ctg tcc 1544
 His Asp Leu Ser Arg Glu Tyr Pro His Ile Val Thr Lys Leu Leu Ser
 485 490 495 500

cgc cta cag ttc tac cat aaa cac tca gtc ccc gtg tac ttc cct gca 1592
 Arg Leu Gln Phe Tyr His Lys His Ser Val Pro Val Tyr Phe Pro Ala
 505 510 515

cag gac ccc cgc tgt gat ccc aag gcc act ggg gtg tgg ggc cct tgg 1640
 Gln Asp Pro Arg Cys Asp Pro Lys Ala Thr Gly Val Trp Gly Pro Trp
 520 525 530

atg taggatttca ggg 1656
 Met

<210> 2
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> 人種

<400> 2

Met Gly Pro Arg Gly Ala Ala Ser Leu Pro Arg Gly Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30

Ala Pro Pro Gly Ser Gly Ala Gly Ala Ser Arg Pro Pro His Leu Val
 35 40 45

Phe Leu Leu Ala Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asp Val Gly Phe His Gly
 50 55 60

Ser Arg Ile Arg Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Leu Leu Asp Asn Tyr Tyr Thr Gln Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ser
85 90 95

Gln Leu Leu Thr Gly Arg Tyr Gln Ile Arg Thr Gly Leu Gln His Gln
100 105 110

Ile Ile Trp Pro Cys Gln Pro Ser Cys Val Pro Leu Asp Glu Lys Leu
115 120 125

Leu Pro Gln Leu Leu Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Thr His Met Val Gly
130 135 140

Lys Trp His Leu Gly Met Tyr Arg Lys Glu Cys Leu Pro Thr Arg Arg
145 150 155 160

Gly Phe Asp Thr Tyr Phe Gly Tyr Leu Leu Gly Ser Glu Asp Tyr Tyr
165 170 175

Ser His Glu Arg Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Asn Val Thr Arg Cys
180 185 190

Ala Leu Asp Phe Arg Asp Gly Glu Glu Val Ala Thr Gly Tyr Lys Asn
195 200 205

Met Tyr Ser Thr Asn Ile Phe Thr Lys Arg Ala Ile Ala Leu Ile Thr
210 215 220

Asn His Pro Pro Glu Lys Pro Leu Phe Leu Tyr Leu Ala Leu Gln Ser
225 230 235 240

Val His Glu Pro Leu Gln Val Pro Glu Glu Tyr Leu Lys Pro Tyr Asp
245 250 255

Phe Ile Gln Asp Lys Asn Arg His His Tyr Ala Gly Met Val Ser Leu
260 265 270

Met Asp Glu Ala Val Gly Asn Val Thr Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly
275 280 285

Leu Trp Asn Asn Thr Val Phe Ile Phe Ser Thr Asp Asn Gly Gly Gln
290 295 300

Thr Leu Ala Gly Gly Asn Asn Trp Pro Leu Arg Gly Arg Lys Trp Ser
305 310 315 320

Leu Trp Glu Gly Gly Val Arg Gly Val Gly Phe Val Ala Ser Pro Leu
325 330 335

Leu Lys Gln Lys Gly Val Lys Asn Arg Glu Leu Ile His Ile Ser Asp
340 345 350

Trp Leu Pro Thr Leu Val Lys Leu Ala Arg Gly His Thr Asn Gly Thr
355 360 365

Lys Pro Leu Asp Gly Phe Asp Val Trp Lys Thr Ile Ser Glu Gly Ser
370 375 380

Pro Ser Pro Arg Ile Glu Leu Leu His Asn Ile Asp Pro Asn Phe Val
385 390 395 400

Asp Ser Ser Pro Cys Pro Arg Asn Ser Met Ala Pro Ala Lys Asp Asp
405 410 415

Ser Ser Leu Pro Glu Tyr Ser Ala Phe Asn Thr Ser Val His Ala Ala
420 425 430

Ile Arg His Gly Asn Trp Lys Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Cys Gly
435 440 445

Tyr Trp Phe Pro Pro Pro Ser Gln Tyr Asn Val Ser Glu Ile Pro Ser
450 455 460

Ser Asp Pro Pro Thr Lys Thr Leu Trp Leu Phe Asp Ile Asp Arg Asp
465 470 475 480

Pro Glu Glu Arg His Asp Leu Ser Arg Glu Tyr Pro His Ile Val Thr
485 490 495

Lys Leu Leu Ser Arg Leu Gln Phe Tyr His Lys His Ser Val Pro Val
500 505 510

Tyr Phe Pro Ala Gln Asp Pro Arg Cys Asp Pro Lys Ala Thr Gly Val
515 520 525

Trp Gly Pro Trp Met
530

伍、中文發明摘要：

本發明提供一種高度純化之重組人類前驅物N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶及其生物活性突變株、片段及類似物，以及包含高度純化重組人類前驅物N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶之醫藥調配物。本發明也提供全部或部分由於缺乏人類N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶引發之疾病(包括MPS VI)之治療方法，以及製造且純化該重組前驅物酶至高度純化形式之方法。

陸、英文發明摘要：

The present invention provides a highly purified recombinant human precursor *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase and biologically active mutants, fragments and analogs thereof as well as pharmaceutical formulations comprising highly purified recombinant human precursor *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase. The invention also provides methods for treating diseases caused all or in part by deficiencies in human *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase including MPS VI and methods for producing and purifying the recombinant precursor enzyme to a highly purified form.

拾壹、圖式：

公告本

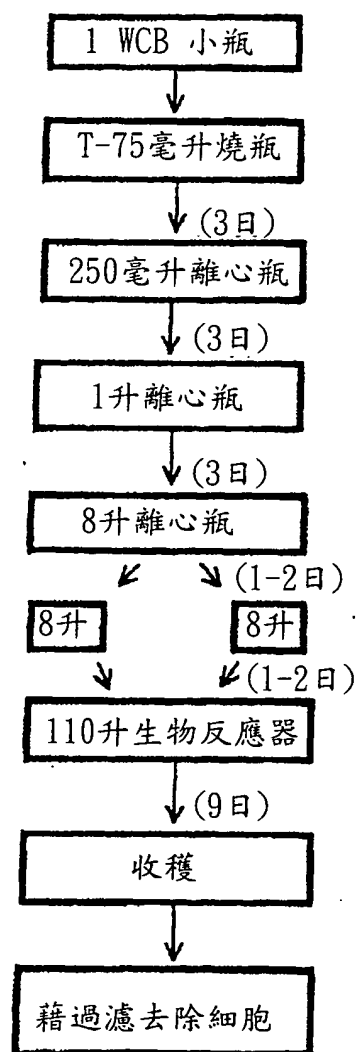


圖 1

rhASB藥物純化法摘要

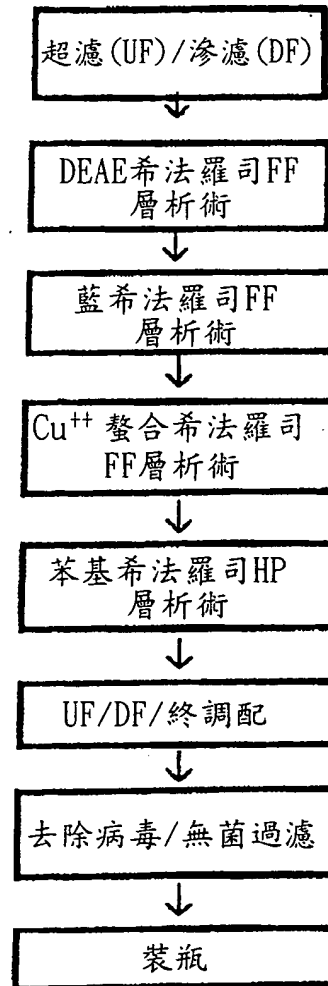


圖 2

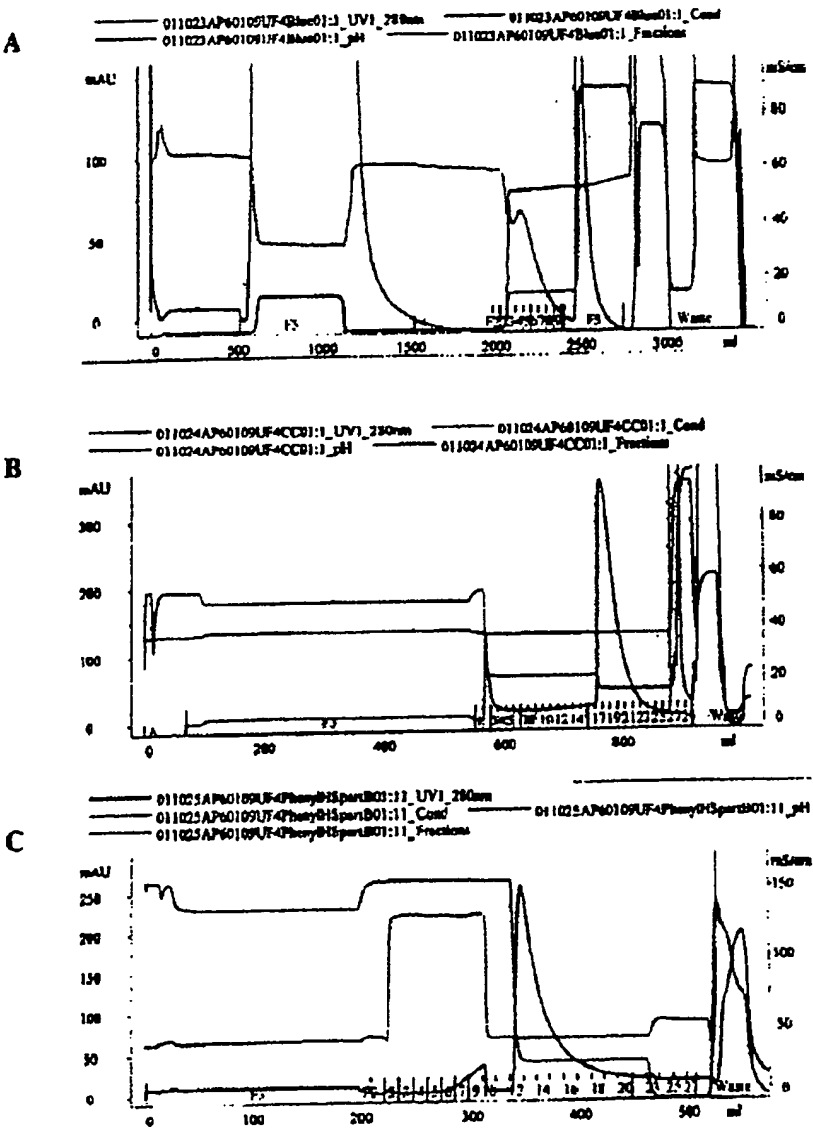


圖 4

處理中試樣之銀-染色SDS-PAGE

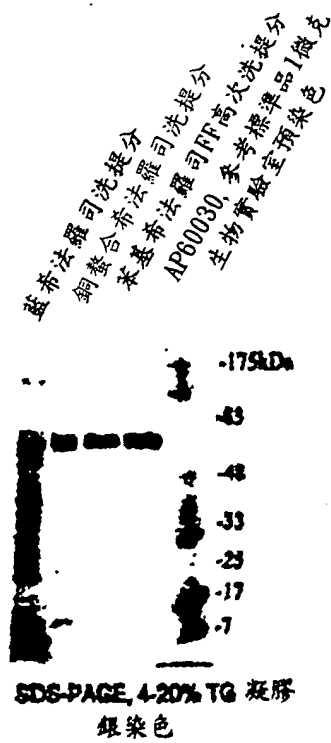


圖 5

由AC60109和AC060109A次批料純化而得之rhASB之SDS-PAGE

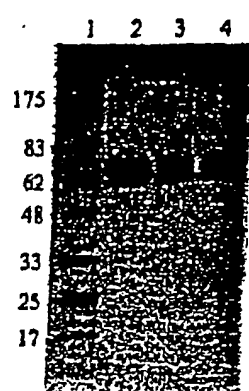


圖 6A

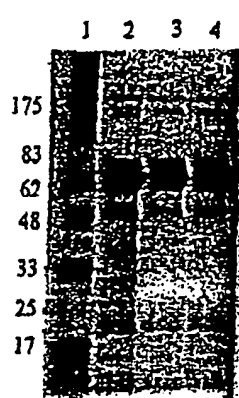


圖 6B

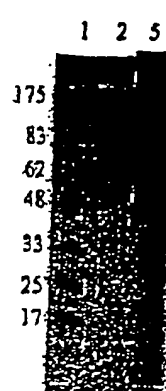


圖 6C

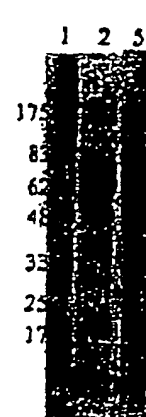


圖 6D

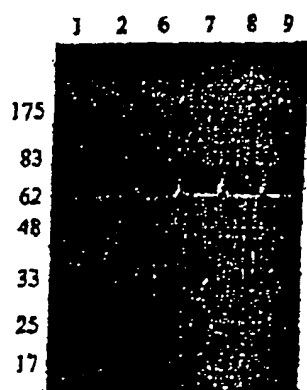


圖 6E

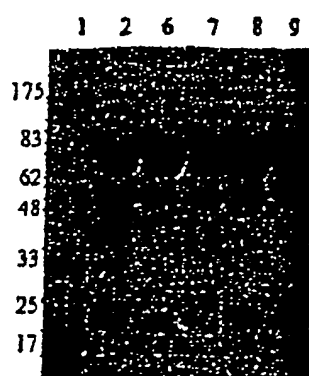


圖 6F

4-20%聚丙烯醯胺梯度SDS凝膠, 以庫馬西R-250或銀染色

- 1 NEB寬廣範圍預染色標準品
- 2 5 μ g ASB AS60001 (批次法)
- 3 5 μ g AP60109UF4
- 4 5 μ g AP60109UF10
- 5 5 μ g AP60109UF15
- 6 5 μ g AP60109AUF18
- 7 5 μ g AP60109AUF22
- 8 5 μ g AP60109AUF25
- 9 5 μ g AP60109AUF27

AC60202經純化之rhASB之分析

經調配之rhASB, 052202

5微克/線道

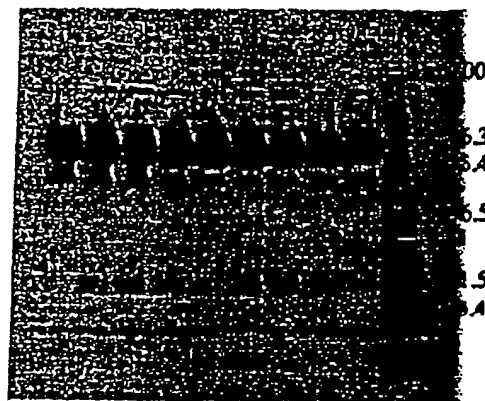


圖 7A



圖 7B

- | | |
|------------------|------------------|
| 1. AP60202 UF 4 | 6. 102PD0139x B5 |
| 2. AP60202 UF 10 | 7. rhASB-202-002 |
| 3. AP60202 UF 18 | 8. 102PD0136 P1 |
| 4. AP60202 (BMK) | 9. 102PD0136 P2 |
| 5. 102PD0139x B3 | 10. 記號12標準品 |



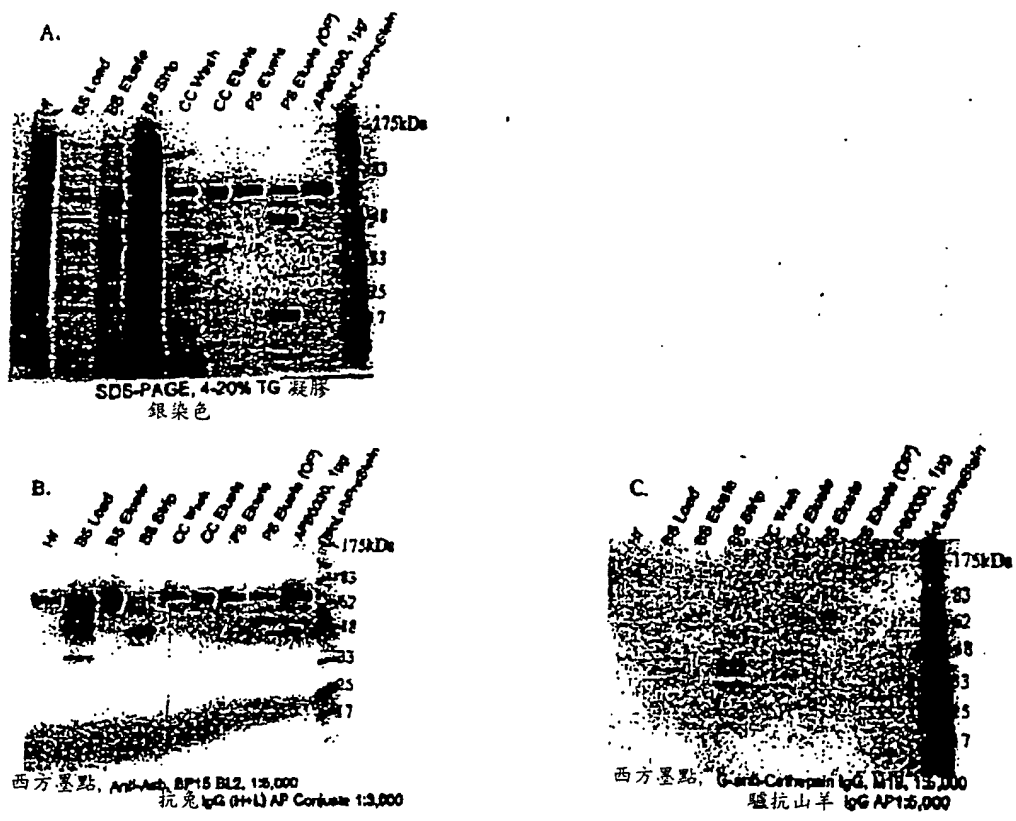


圖 9

MPS VI 1期研究 血清抗體力價

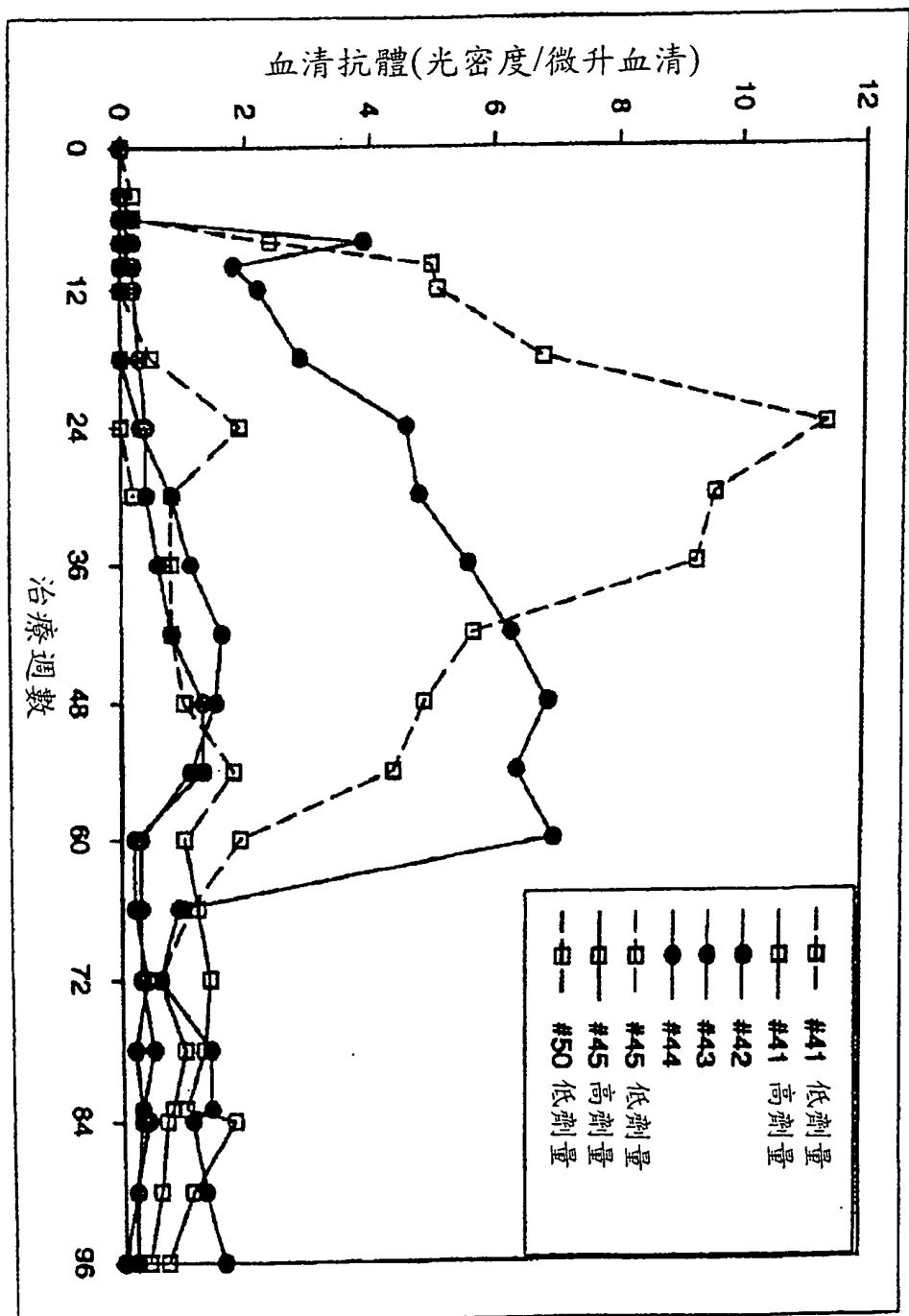


圖 10

MPS VI I期研究
總尿液GAGs-時程

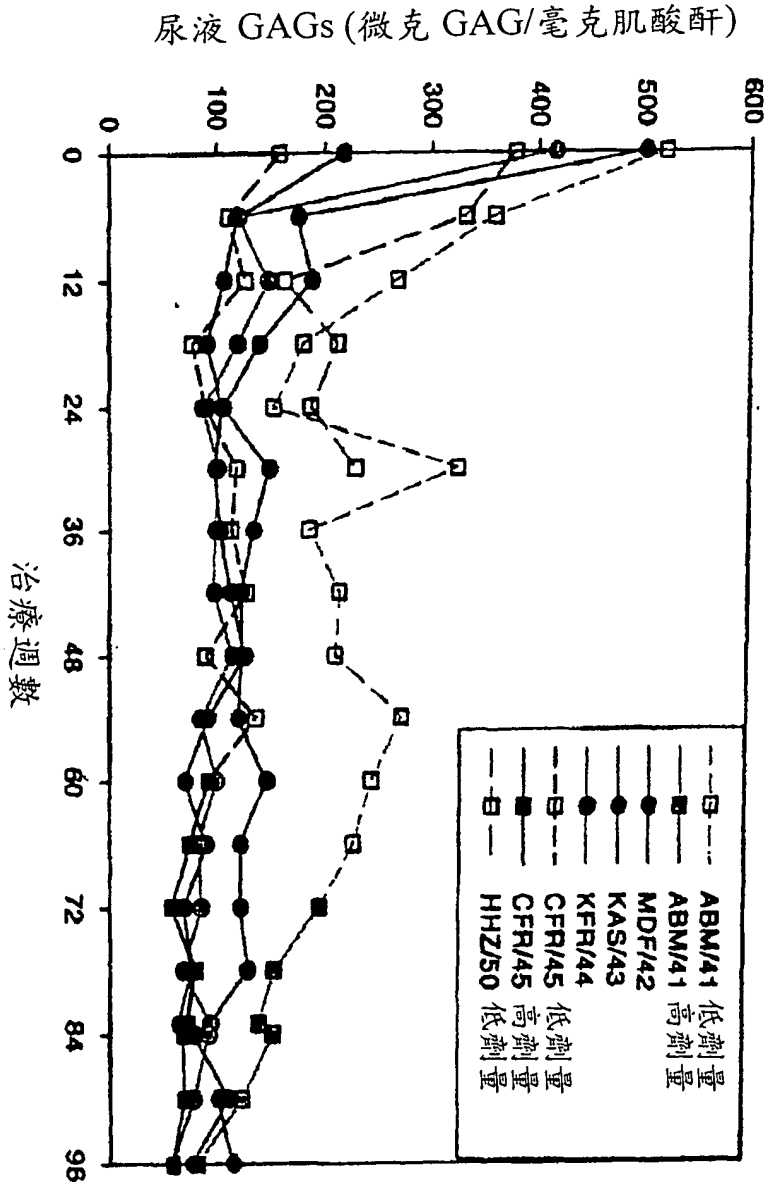


圖 11

MPS VI 1期研究
總尿液GAGs-規度化

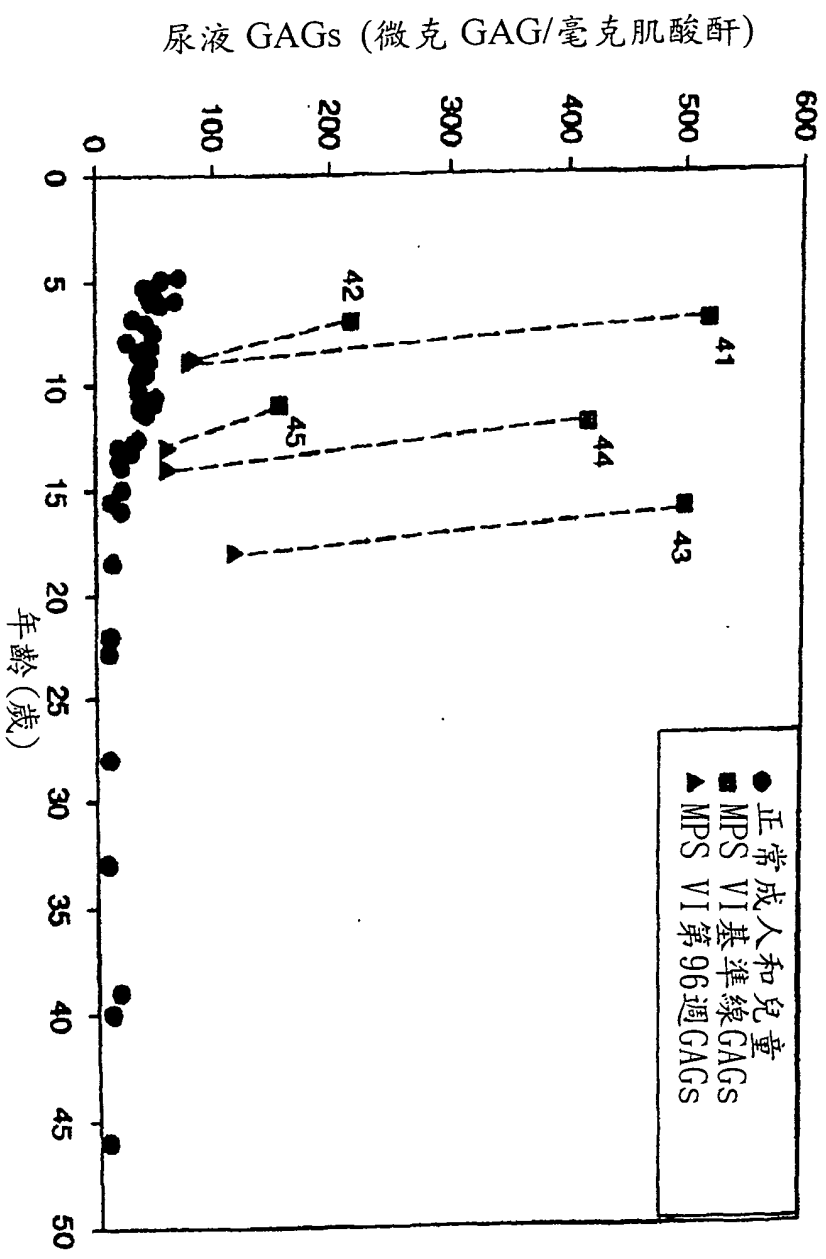


圖 12

MPS VI 1期研究 6分鐘走路試驗

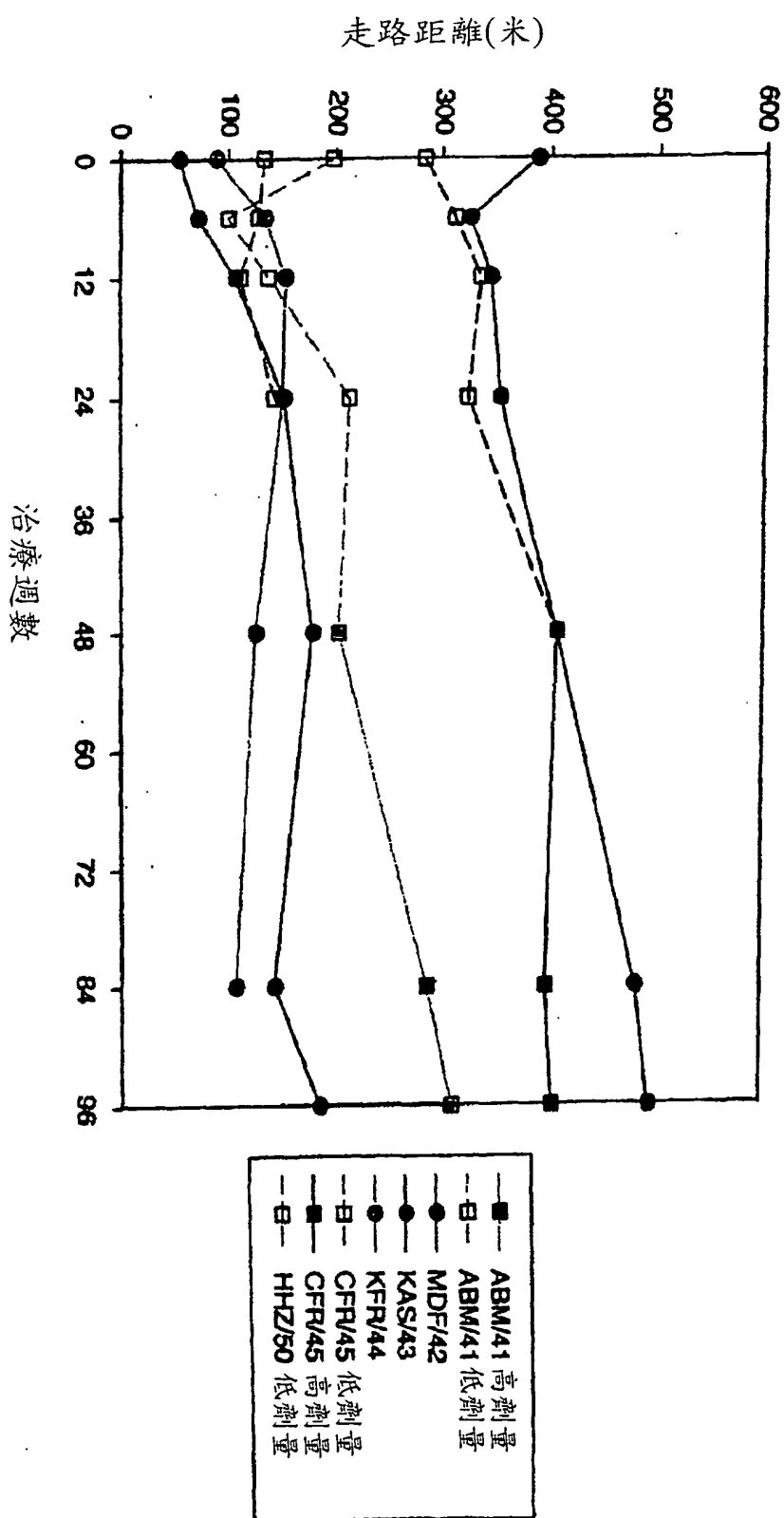


圖 13

MPS VI 2期研究
經48週之血清抗體力價

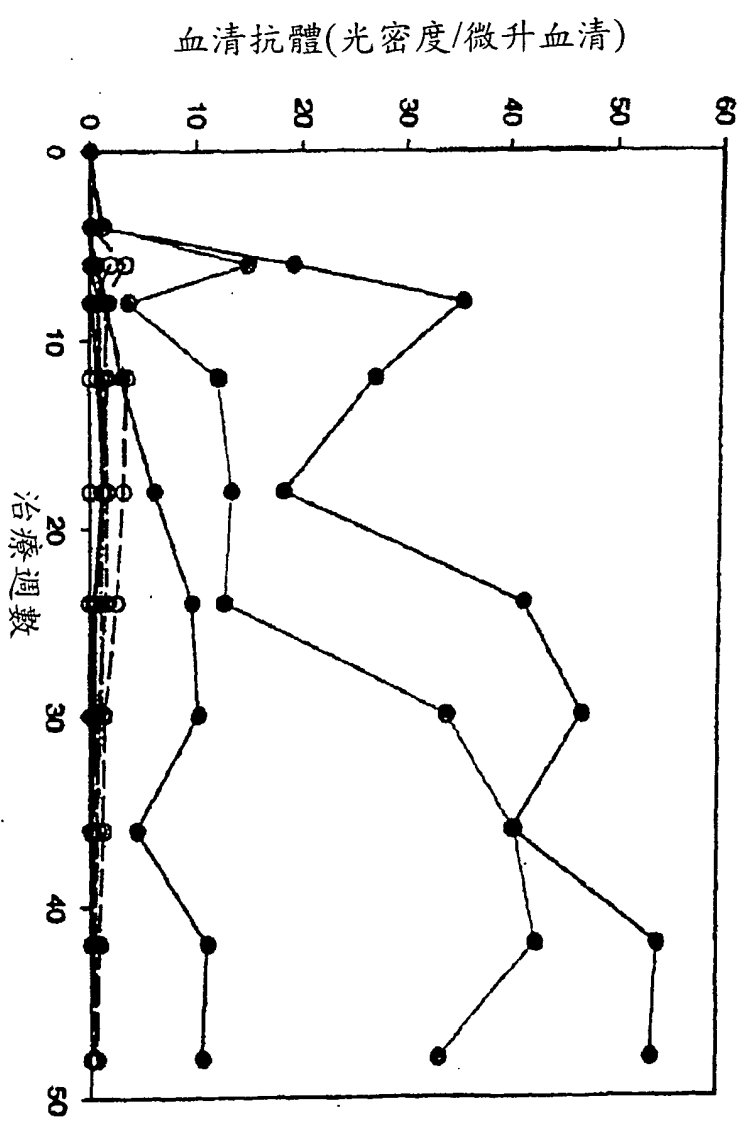
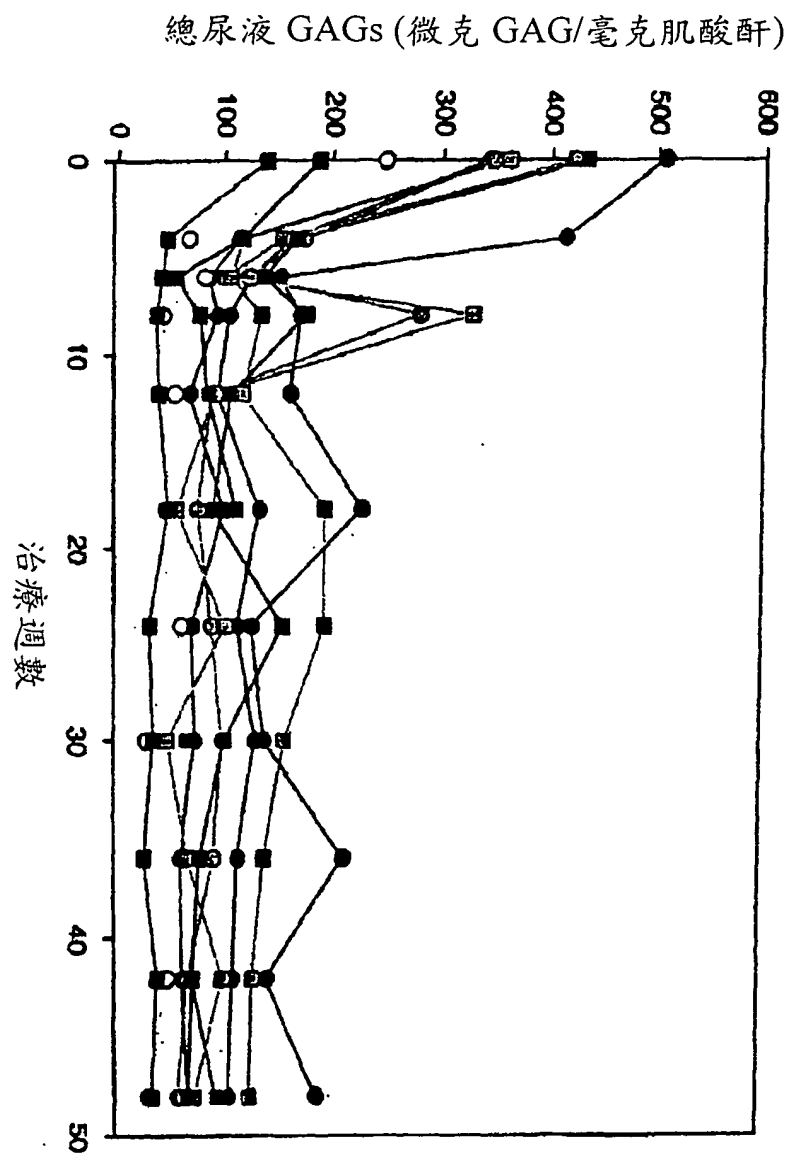


圖 14

MPS VI 2期研究
總尿液GAGs



24週時平均降低71%, 48週時76%

圖 15

MPS VI 2期研究
相對於該年齡正常值, 第48週尿液GAGs之降低

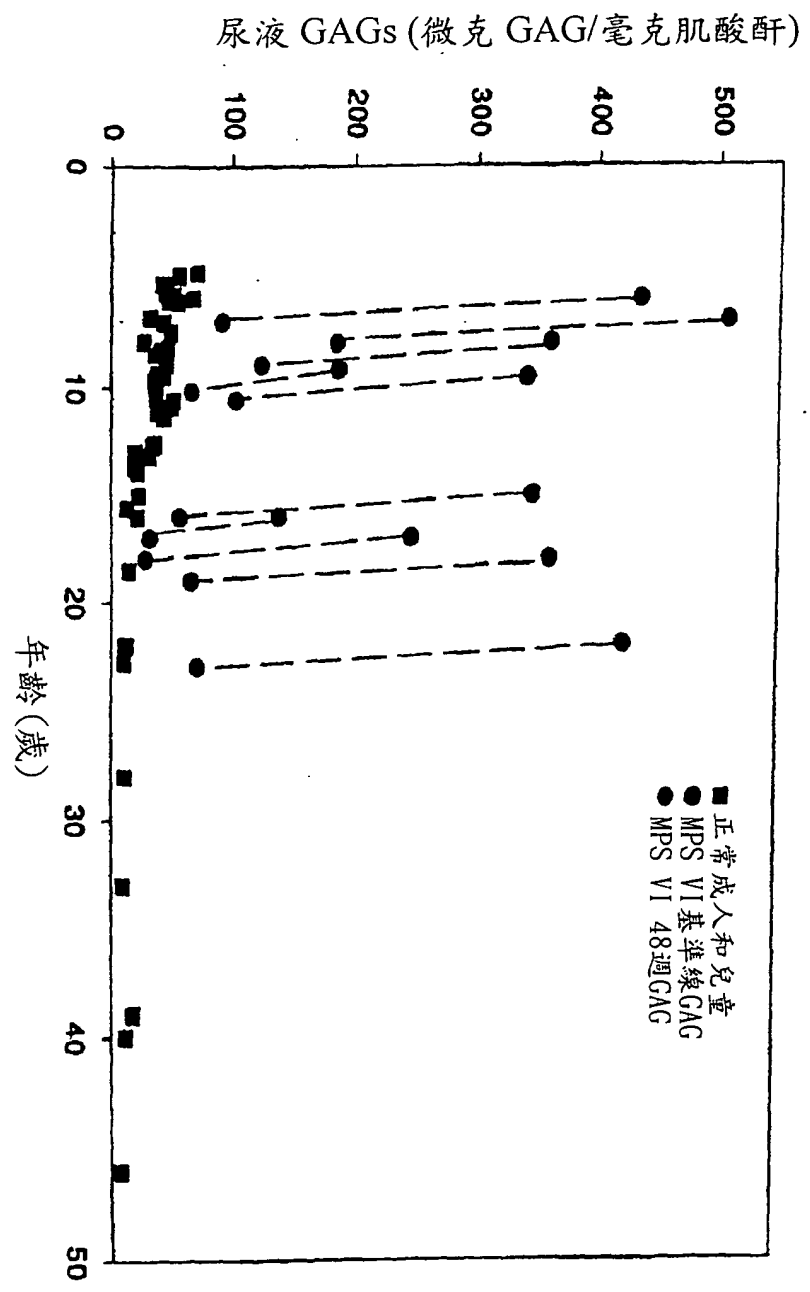
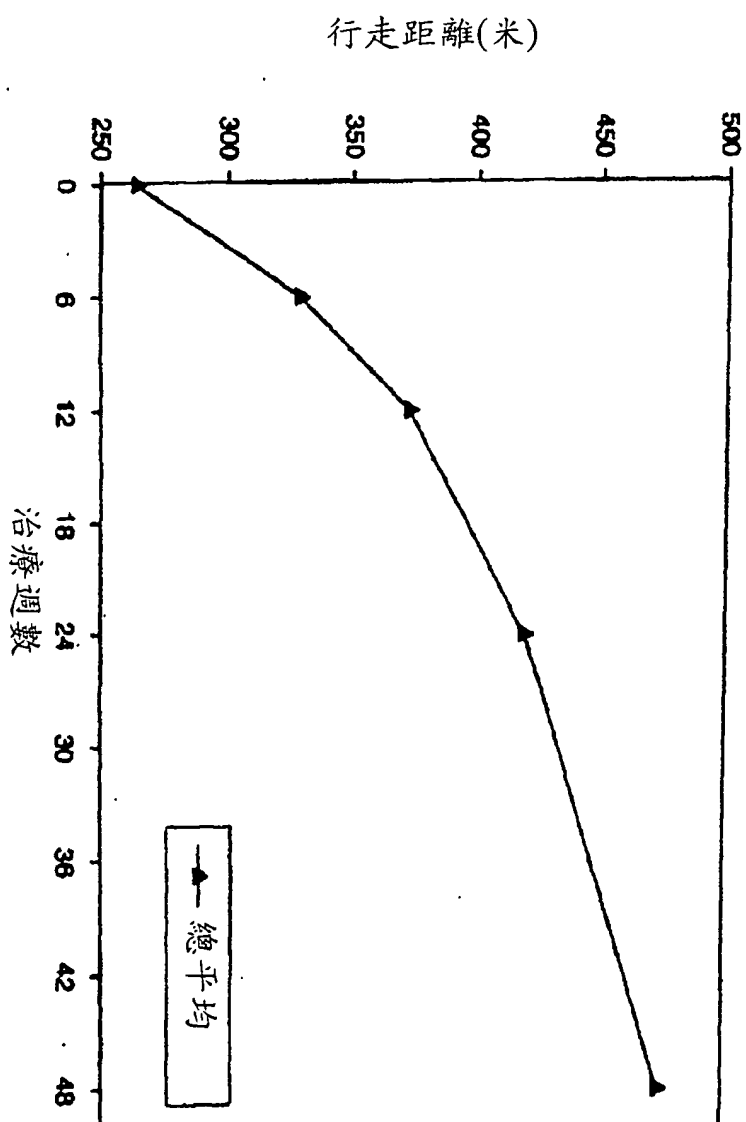


圖 16

MPS VI 2期研究

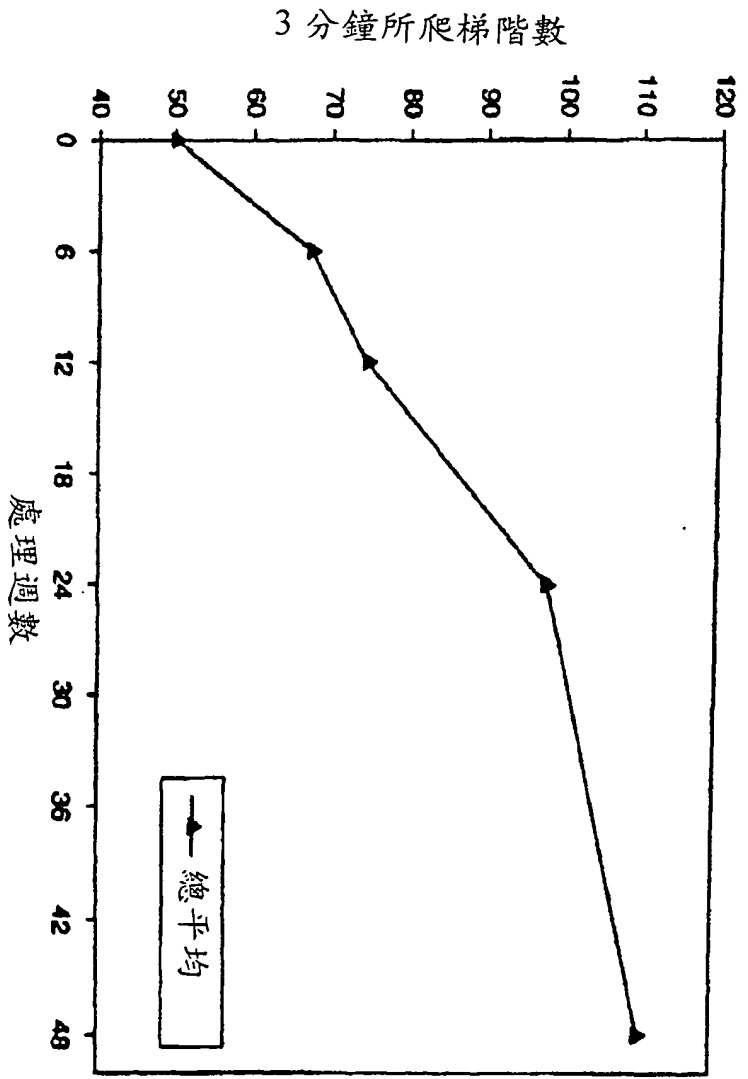
12分鐘走路試驗-12分鐘時間點



每位病人：第24週時98%改善，第48週時127%改善

圖 17

MPS VI 2期研究
3分鐘爬樓梯



每位病人：第24週時110%改善，第48週時147%改善

圖 18

MPS VI 2期研究
擴大計時起身行走-總時間

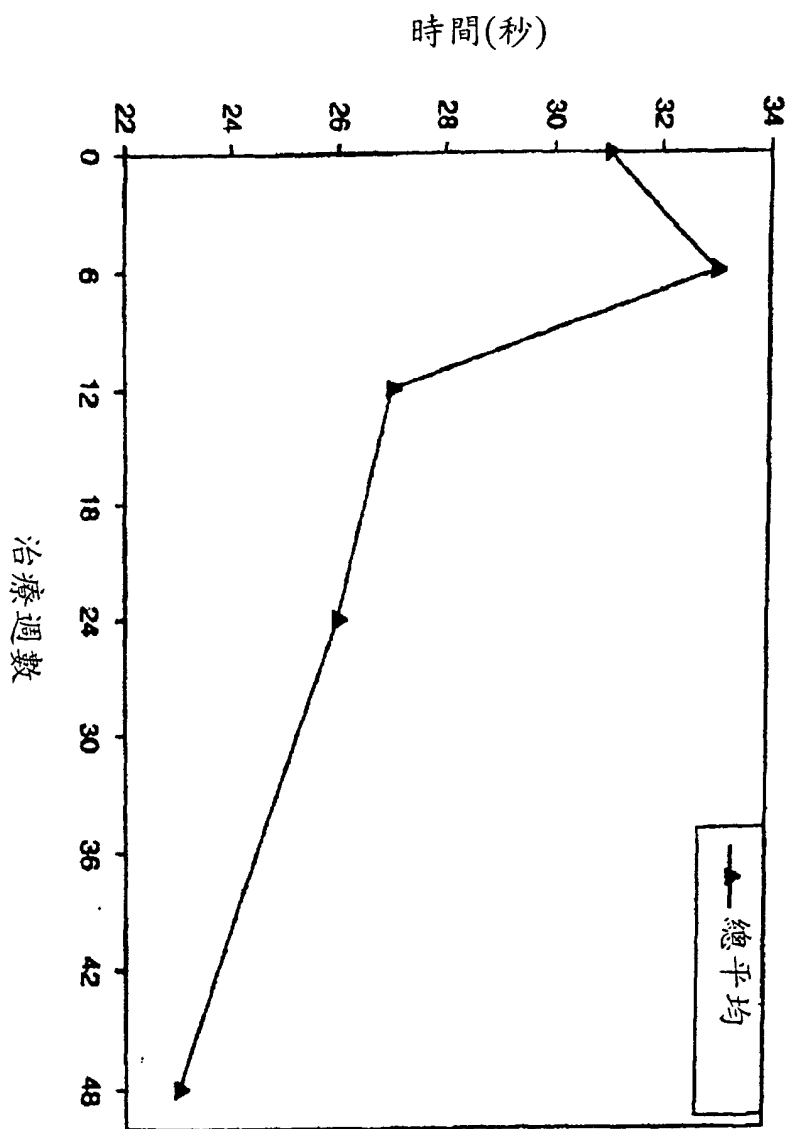


圖 19

MPS VI 2期研究 關節疼痛問卷

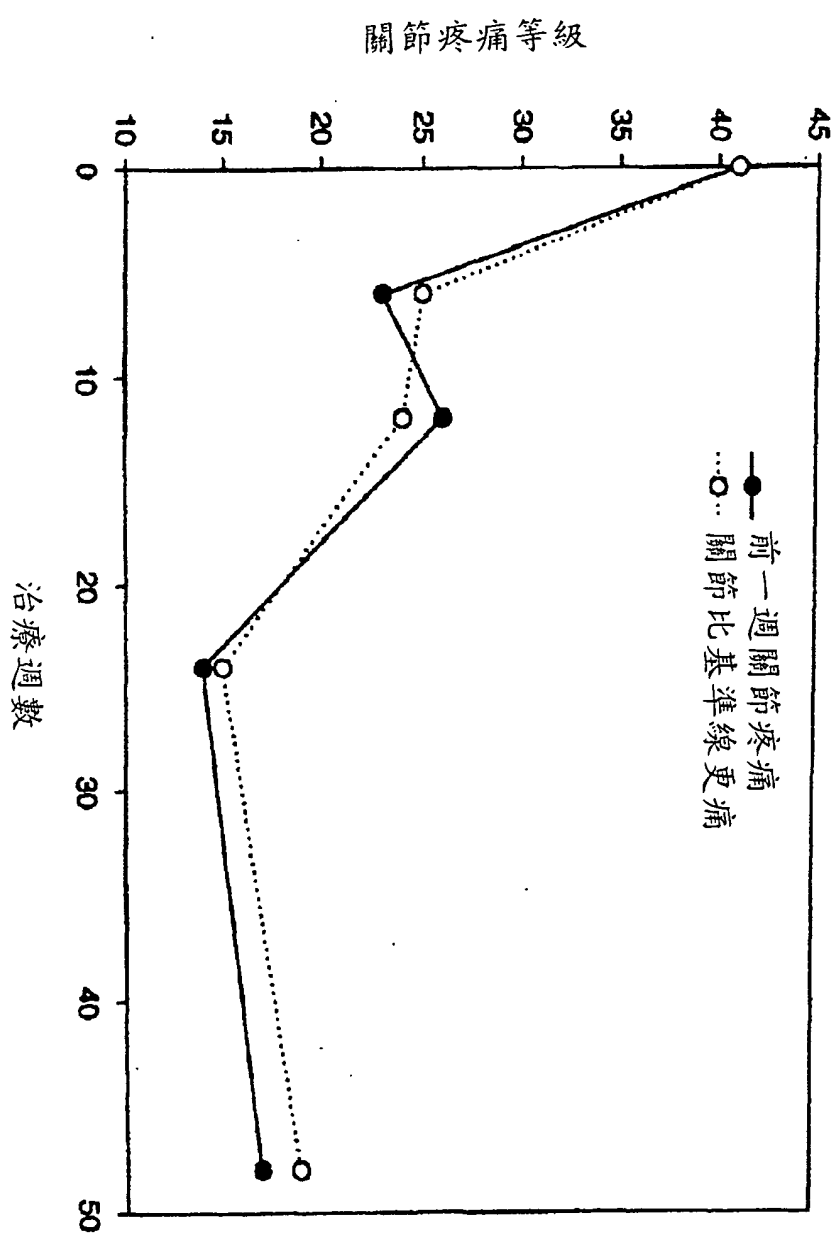


圖 20

MPS VI 2期研究 關節僵硬問卷

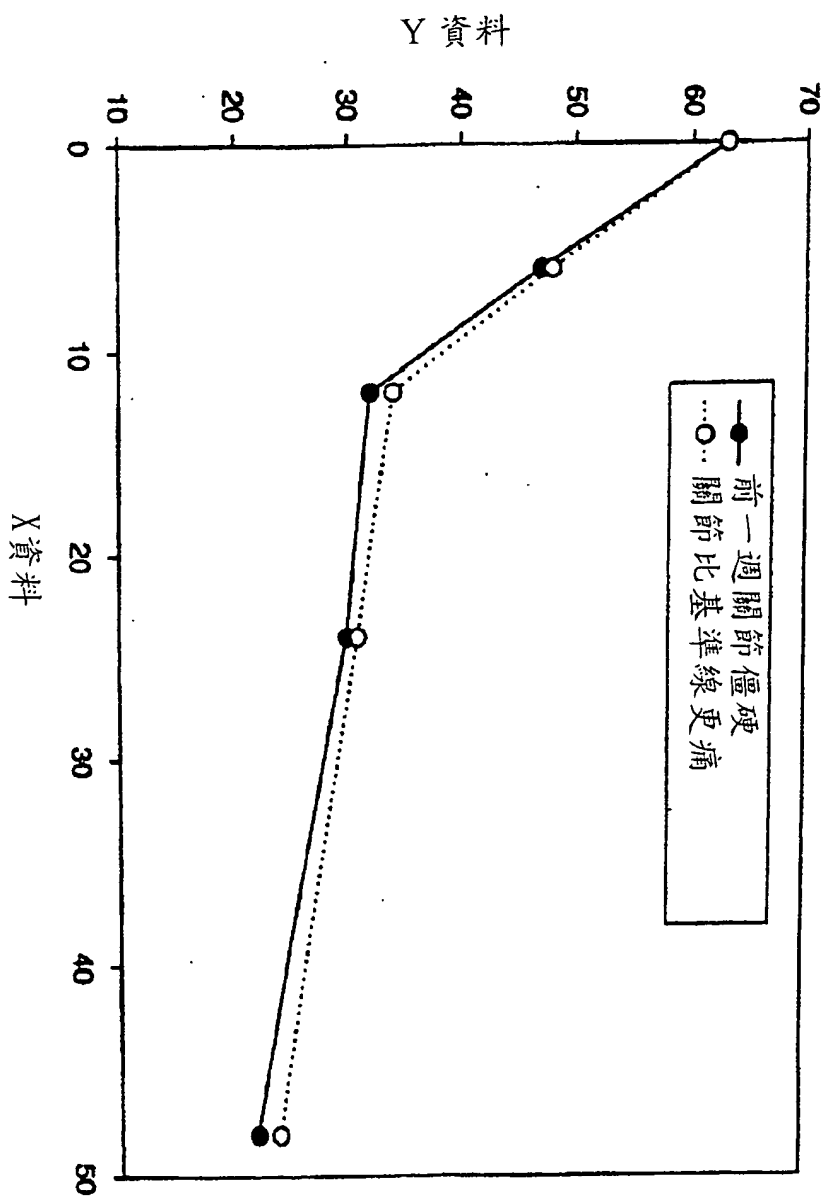


圖 21

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

公告本**拾、申請專利範圍：**

1. 一種治療全部或部分由於缺乏N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶引發之疾病之醫藥組合物，包含前驅物人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，其中該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶以總蛋白質為基準，具有純度至少等於或大於99%，其中該純度係使用反相HPLC (RP-HPLC)方法測定，且其中該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶於庫馬希染色十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)不含約47-48 kDa之可偵測線帶。
2. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該前驅物人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶基於總蛋白質，具有純度至少等於或大於99.2%，其中該純度係使用反相HPLC方法測定。
3. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該前驅物人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶係經過糖基化。
4. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該純度係等於或大於99.5%。
5. 如申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該純度係等於或大於99.9%。
6. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之醫藥組合物，其中該前驅物人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶為重組前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。
7. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之醫藥組合物，其中該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶基於總蛋白質，具

- 有純度至少等於或大於99%，其中該純度係使用尺寸排除層析術-HPLC (SEC-HPLC)方法測定。
8. 如申請專利範圍第7項之醫藥組合物，其中該藉SEC-HPLC測得之純度係等於或大於99.5%。
 9. 如申請專利範圍第7項之醫藥組合物，其中該藉RP-HPLC測得之純度係等於或大於99%以及藉SEC-HPLC測得之純度係等於或大於99.5%。
 10. 如請求項1之醫藥組合物，其進一步包含醫藥上可接受之載劑。
 11. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，進一步包含氯化鈉溶液及非離子清潔劑。
 12. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其中該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之存在濃度為約1-5毫克/毫升或約50至約250單位/毫升。
 13. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其進一步包含濃度約10-50 mM之磷酸鈉緩衝劑。
 14. 如申請專利範圍第13項之醫藥組合物，其中該緩衝液之pH係維持於約5.8。
 15. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，進一步包含一種聚氧伸乙基聚山梨糖醇。
 16. 如申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其中該聚氧伸乙基聚山梨糖醇為聚氧伸乙基聚山梨糖醇20或80，以及該聚氧伸乙基聚山梨糖醇20或80之濃度約為0.005%(重量/容積)。

17. 一種以總蛋白質為基準具有純度至少等於或大於99%之前驅物人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶於製備治療全部或部分因N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶缺乏所引起之疾病之藥劑之用途，其中該純度係使用反相HPLC方法測定，且其中該前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶於庫馬希染色十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)不含約47-48 kDa之可偵測線帶。
18. 如申請專利範圍第17項之用途，其中該疾病為黏多醣病。
19. 如申請專利範圍第18項之用途，其中該疾病為MPS VI。
20. 如申請專利範圍第17項之用途，其中該疾病為馬洛投-拉米症候群(Maroteaux-Lamy Syndrome)。
21. 如申請專利範圍第17項之用途，其中該病人具有正常N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶活性之約10%或以下之活性。
22. 如申請專利範圍第17項之用途，其中每週投予病人至少約50單位/公斤或至少約1毫克/公斤前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。
23. 如申請專利範圍第17項之用途，其中每週投予病人至少約100單位/公斤或至少約2.0毫克/公斤前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。
24. 一種製造重組前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶酵素之方法，包含下列步驟：
 - (a) 生長被轉移感染有編碼人類N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之DNA之細胞，其中該細胞係中國倉鼠卵巢細胞；

- (b) 將該經轉移感染細胞導入生物反應器內；
 - (c) 供給適當生長培養基至該生物反應器，其中該生長培養基包含 JRH Excell 302 培養基補充一或多種選自由 L-麩胺、葡萄糖、次黃嘌呤/胸腺苷、絲胺酸、天冬醯胺及葉酸組成之群組之試劑；
 - (d) 收穫含酶之生長培養基；
 - (e) 由收穫之培養基實質上去除被轉移感染之細胞；及
 - (f) 自收穫培養基純化重組前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶達以總蛋白質為基準至少 99% 之純度。
25. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該生長培養基不含 G418。
26. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該經轉移感染之細胞係於生物反應器生長至約 45 日。
27. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該經轉移感染之細胞係於生物反應器生長至約 90 日。
28. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該經轉移感染之細胞係由含酶之培養基通過接續多薄膜實質分離。
29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該接續薄膜厚度為 4.0-0.75 微米名目厚度、0.45 微米及 0.2 微米。
30. 一種純化前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之方法，其中該前驅物 N-乙醯半乳糖-4-硫酸酯酶以總蛋白質為基準具有純度至少 99%，包含：
- (a) 獲得流體含有如申請專利範圍第 24 項之前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；

- (b) 減少該流體中可裂解前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶之蛋白酶之蛋白質分解活性，其中該降低不會有損該前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶；
 - (c) 該流體接觸希布康藍 (Cibracon blue) 染料交互作用層析術樹脂，其中該接觸包含流體通過希布康藍染料交互作用層析術管柱；
 - (d) 流體接觸銅螯合層析術樹脂其中該接觸包含流體通過銅螯合層析術管柱；
 - (e) 流體接觸苯基疏水交互作用層析術樹脂其中該接觸包含流體通過苯基疏水交互作用層析術管柱；
 - (f) 回收前驅物 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶。
31. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該獲得進一步包含濃縮流體至約 20 倍。
 32. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該降低包含調整流體 pH 至約 4.8 至 5.5。
 33. 如申請專利範圍第 32 項之方法，其中該降低包含調整流體 pH 至約 4.8 至 5.2。
 34. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該希布康藍染料交互作用層析術管柱為藍希法羅司 (Sephacrose) 6 快速流管柱。
 35. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該銅螯合層析術管柱為螯合希法羅司快速流管柱。
 36. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該苯基疏水交互作用層析術管柱為苯基希法羅司 6 快速流高次管柱。
 37. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該步驟 (c)、(d) 及 (e)

之時間順序為步驟(c)、步驟(d)及步驟(e)。

38. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該回收包含流體之滲濾。
39. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該回收包含過濾流體而去除DNA。
40. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該回收包含過濾流體而去除病毒。
41. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該過濾包含流體通過0.2微米過濾器。
42. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該純度係使用反相HPLC方法測定。
43. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該流體未接觸DEAE希法羅司樹脂。
44. 一種治療全部或部分由於缺乏N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶引發之疾病之醫藥組合物，包含前驅物N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶，其中該前驅物N-乙醯半乳糖-4-硫酸酯酶以總蛋白質為基準具有純度至少99%，以及一種濃度於約0.002%至約0.008%(重量/容積)範圍之波利索貝80。
45. 如申請專利範圍第44項之醫藥組合物，其中該波利索貝80以濃度0.005%(重量/容積)使用。