

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成27年7月2日(2015.7.2)

【公表番号】特表2014-517692(P2014-517692A)

【公表日】平成26年7月24日(2014.7.24)

【年通号数】公開・登録公報2014-039

【出願番号】特願2014-511591(P2014-511591)

【国際特許分類】

C 12 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 12 N 9/16 Z

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月15日(2015.5.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

高pIのHNSの低下した量を含むヘパラン-N-スルファターゼ(HNS)の精製のための方法であって、

(a) バルクHNS組成物とアニオン交換クロマトグラフィー樹脂とを接触させる工程と

(b) pH約7.0に調節することによってアニオン交換クロマトグラフィー樹脂から該バルクHNS組成物からのHNSを抽出および/または精製する工程と、

を含み、それによって、該バルクHNS組成物から抽出および/または精製されたHNSが、高pIのHNSの低下した量を含む、方法。

【請求項2】

pH約7.0の塩を含む緩衝液で前記樹脂を洗浄して、高pIのHNSを除去する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法が、前記バルクHNS組成物に存在する高pIのHNSのうち約10～約25%を除去する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記高pIのHNSの除去が、抽出および/または精製されたHNSの改善された溶解度をもたらす、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記改善された溶解度が、少なくとも15g/Lである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記方法が、HNSを抽出する前に、pH約7.0において、約20mM MES-Triisおよび約20mM NaClを含む約5カラム容積の緩衝液でアニオン交換カラムを洗浄する工程を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記方法が、pH約7.0において、約20mM MES-Triisおよび約180mM NaClで構成される緩衝液を使用して、前記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂からHNSを溶出する工程を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記バルクHNS組成物と前記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂とを接触させる前

に、前記バルクHNS組成物の導電率を約3～約4mS/cmの導電率を得るように調節する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記バルクHNS組成物が、前記アニオン交換カラムに添加される前に、ウイルス不活性化される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記方法が、前記抽出および／または精製されたHNSと疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー樹脂、および／またはカチオン交換クロマトグラフィー樹脂とを接触させる工程をさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記アニオン交換クロマトグラフィー工程から得られる前記抽出および／または精製されたHNSが、疎水性相互作用工程のための出発材料であり、必要に応じて、前記抽出／精製されたHNSのNaCl濃度を、前記HNS組成物と疎水性相互作用カラムとを接触させる前に、約1.1M～約1.5M NaClに調節する、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記疎水性相互作用カラムから得られるHNS組成物が、ヒドロキシアパタイトカラムを使用する精製のための出発材料として使用され、必要に応じて、前記疎水性相互作用カラムからの溶出後のHNS組成物のNaPO₄濃度を、約2mM～約4mMに調節する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ヒドロキシアパタイトカラムから得られるHNS組成物が、カチオン交換カラムを使用する精製のための出発材料として使用され、必要に応じて、前記HNS組成物の導電率を、前記カチオン交換カラムに添加する前に約3～約4mS/cmに調節する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項に記載の方法により得られるHNS組成物。

【請求項15】

15g/Lを上回るHNS濃度を有する高pIのHNSの低下した量を含むHNS組成物。

【請求項16】

前記HNS組成物が、高pIのHNSを実質的に含まない、請求項15に記載のHNS組成物。

【請求項17】

ムコ多糖症(MPS)IIIAの処置において使用するための、請求項14～16のいずれか一項に記載のHNS組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

ヘパラン-N-スルファターゼを精製するための方法であって、該方法は、

a) ヘパラン-N-スルファターゼ組成物とアニオン交換クロマトグラフィー樹脂とを、該ヘパラン-N-スルファターゼが吸着される条件下で接触させる工程；

b) 吸着された該ヘパラン-N-スルファターゼを、該アニオン交換クロマトグラフィ

ー樹脂から溶出する工程；

c) 工程 b) から得られた該ヘパラン - N - スルファターゼ組成物と、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂とを接触させる工程；

d) 吸着された該ヘパラン - N - スルファターゼを、該疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂から溶出する工程；

e) 工程 d) から得られた該ヘパラン - N - スルファターゼ組成物とヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー樹脂とを接触させる工程；

f) 吸着された該ヘパラン - N - スルファターゼを、該ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー樹脂から溶出する工程；

g) 工程 f) から得られた該ヘパラン - N - スルファターゼ組成物とカチオン交換クロマトグラフィー樹脂とを接触させる工程；および

h) 吸着された該ヘパラン - N - スルファターゼを、該カチオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出する工程、

を包含する、方法。

(項目 2)

ヘパラン - N - スルファターゼ組成物と、4 - メルカプト - エチル - ピリジンに連結したセルロースマトリクスとを接触させる工程
をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物中のウイルスを不活性化する工程
をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

工程 a) の前記アニオニン交換クロマトグラフィー樹脂は、Q セファロースファストフロー樹脂である、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

工程 c) の前記疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂は、フェニルセファロース 6 ファストフロー樹脂である、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

工程 e) の前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー樹脂は、セラミックヒドロキシアパタイトタイプ I 樹脂である、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

工程 g) の前記カチオン交換クロマトグラフィー樹脂は、S P セファロースファストフロー樹脂である、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記ヘパラン - N - スルファターゼを濾過する工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

濾過工程は、ダイアフィルトレーションもしくは限外濾過によって行われる、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

工程 a) を行う前に、前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を pH 約 7 . 0 へと調節する工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記溶液は、約 50 ~ 約 100 mM の酢酸ナトリウム濃度を有する、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

工程 a) を行う前に、前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を調節して、約 3 ~ 約 4 mS / cm の導電率を得る工程、
をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

工程 b) の溶出剤は、約 pH 7 . 0 において約 2 0 m M MES - Tris および約 1 8 0 m M NaCl を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

工程 c) を行う前に、前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を、NaCl 濃度 約 1 . 1 M ~ 約 1 . 5 M NaCl を達成するように調節する工程、をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記 NaCl 濃度は、約 1 . 2 M である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記組成物を、2 5 において導電率 約 9 0 ~ 1 1 0 m S / cm を得るように調節する工程、

をさらに包含する、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

工程 c) を行う前に、前記樹脂を、pH 約 7 . 0 および導電率 約 1 0 0 ~ 約 1 2 0 m S / cm において約 2 0 m M MES - Tris および NaCl 濃度 約 1 . 2 M を含む緩衝液で平衡化する工程、

をさらに包含する、

項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

工程 c) の吸着された前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を、pH 約 7 . 0 において約 2 0 m M MES - Tris および NaCl 濃度 約 1 8 0 m M ~ 約 2 2 0 m M を含む溶出剤で平衡化する工程、

をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記 NaCl 濃度は、約 2 0 0 m M である、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

工程 d) において得られた前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を含む溶液を、工程 e) を行う前に、濃度 約 2 m M ~ 約 4 m M の NaPO₄ へと調節する工程、

をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記 NaPO₄ の濃度は、約 2 m M に調節される、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

工程 e) において前記ヘパラン - N - スルファターゼを前記樹脂から、pH 約 7 . 5 において 2 5 m M NaPO₄ を含む溶出剤で溶出する工程、

をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

工程 f) において得られた前記ヘパラン - N - スルファターゼ組成物を、工程 g) を行う前に、導電率 約 3 ~ 約 4 m S / cm を得るように調節する工程、

をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記導電率は、約 3 m S / cm であり、前記溶液は、約 pH 5 . 0 において約 2 0 m M 醋酸ナトリウムを含む、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記導電率は、約 4 m S / cm であり、前記溶液は、約 pH 5 . 0 において約 4 0 m M 醋酸ナトリウムを含む、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

工程 h) は、pH 約 5 において約 5 0 m M 醋酸ナトリウムおよび約 9 0 m M NaC l を含む溶出剤で行われる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記溶出剤は、導電率 約 1 2 ~ 約 1 4 m S / cm を有する、項目 2 6 に記載の方法。

本発明の上記で考査される、多くの他の特徴および付隨する利点は、添付の実施例とともに理解される場合、本発明の以下の詳細な説明を参照することによってよりよく理解されることになる。本明細書に記載される種々の実施形態は、無償提供され、本明細書に含まれる教示に鑑みて、当業者によって理解される様式において一緒に組み合わされ得るかもしくは使用され得る。