



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119979504 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202510351647.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.01.09

C12N 9/16 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/750,693 2013.01.09 US

(62) 分案原申请数据

201480003307.5 2014.01.09

(71) 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪

(72) 发明人 D·尼科尔斯

I·基农尼斯·加西亚 B·L·郑

M·H·蒋

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 张怡 顾云峰

权利要求书2页 说明书49页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

含用于纯化芳基硫酸酯酶A的方法

(57) 摘要

本发明尤其提供了用于纯化重组产生以用于酶替代疗法的芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白的改良方法。本发明部分基于出人意料的发现:使用包括仅仅四个色谱柱和色谱柱后超滤/渗滤仅一个步骤的工艺,重组ASA蛋白可从未经处理的生物材料(例如,含有ASA的细胞培养基)中纯化。

1. 一种纯化重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白的方法,所述方法包括进行一个或多个步骤的病毒灭活;
通过进行一个或多个色谱步骤从不纯制品中纯化重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白,所述一个或多个色谱步骤包括阳离子交换色谱;
合并来自所述所述一个或多个色谱步骤的洗脱液;
调节合并的洗脱液的pH到5.8到6.4;和
对经调节pH的洗脱液进行单一步骤的在色谱步骤之后的超滤和/或渗滤,从而直接将经纯化的重组ASA蛋白交换进入基于盐水的制剂中而不添加缓冲液。
2. 权利要求1所述的方法,其中将所述pH调节到约6.0。
3. 权利要求1所述的方法,其中使用pH 7.0的包含磷酸钠、氯化钠和柠檬酸钠的缓冲液来调节所述pH。
4. 权利要求3所述的方法,其中所述缓冲液包含约0.1-0.5M磷酸钠、0.5-2.5M氯化钠和0.1-0.6M柠檬酸钠,所述缓冲液的pH为7.0。
5. 权利要求1所述的方法,其中其中所述单一步骤的超滤和/或渗滤中仅包括一次的渗滤。
6. 权利要求1所述的方法,其中所述超滤为切向流超滤。
7. 权利要求1所述的方法,其中所述阳离子交换色谱是最后的色谱步骤并且在调节pH之前合并来自所述阳离子交换色谱的洗脱液。
8. 权利要求7所述的方法,其中在进行所述阳离子交换色谱之前进行阴离子交换色谱、混合模式色谱和疏水相互作用色谱中的一种或多种。
9. 权利要求8所述的方法,其中所述阴离子交换色谱利用选自以下组成的组的柱:Q Sepharose™快速流柱、Q Sepharose™高性能柱、Q Sepharose™XL、Capto™Q、DEAE、TOYOPEARL GigaCap®Q、Fractogel®TMAE、Eshmuno™Q、Nuvia™Q或者UNOsphere™Q。
10. 权利要求8所述的方法,其中所述混合模式色谱为羟磷灰石 (HA) 色谱。
11. 权利要求8所述的方法,其中所述疏水相互作用色谱为苯基色谱。
12. 权利要求1所述的方法,其中所述超滤使用膜过滤器,所述膜过滤器包括具有至少10kDA、至少30kDA或至少50kDA分子量截留的孔径。
13. 权利要求1所述的方法,其中所述所述超滤包含聚醚砜或纤维素膜过滤器。
14. 权利要求1所述的方法,其中所述一个或多个步骤的病毒灭活之后为一个或多个色谱步骤。
15. 权利要求1所述的方法,其中所述病毒灭活的步骤包括将去污剂加入不纯制品。
16. 权利要求1所述的方法,其中其中所述不纯制品由无血清培养基制备,所述无血清培养基含有由哺乳动物细胞分泌的重组ASA蛋白。
17. 权利要求1所述的方法,其中所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1 (对应于野生型人ASA蛋白) 至少70%同一的氨基酸序列。
18. 权利要求1所述的方法,其中所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。
19. 权利要求1所述的方法,其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于100ng/mg HCP和/或小于100pg/mg的宿主细胞DNA。

20. 权利要求1所述的方法, 其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于60ng/mg HCP和/或小于50pg/mg宿主细胞DNA。

含用于纯化芳基硫酸酯酶A的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201480003307.5、申请日为2014年1月9日、发明名称为“含用于纯化芳基硫酸酯酶A的方法”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2014/010856的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2013年1月9日,申请号为61/750,693的美国临时专利申请的优先权。上述申请通过引用特此整体并入。

背景

[0004] 异染性脑白质营养不良疾病 (Metachromatic Leukodystrophy Disease, MLD) 是由酶芳基硫酸酯酶A (ASA) 缺乏引起的常染色体隐性疾患。人体中通过ARSA基因编码的ASA是一种将脑苷脂-3-硫酸酯或鞘脂-3-O-硫酸半乳糖基酰基鞘氨醇 (硫苷脂) 分解为脑苷脂和硫酸盐的酶。在缺乏酶的情况下,硫苷脂累积在神经系统 (例如,髓鞘、神经元和胶质细胞) 中,而在内脏中累积程度较少。这些分子和细胞活动的结果是在CNS和PNS内进行性脱髓鞘和轴突缺失,其临床上伴随着严重的运动和认知功能障碍。

[0005] 该疾患的最典型临床特征是中枢神经系统 (CNS) 退化,它导致认知缺损 (尤其例如智力迟钝、精神错乱、失明)。

[0006] MLD本身能在幼儿中出现 (婴儿后期形式),其中出生刚满一周岁 (例如,在约15-24月) 之后的受感染儿童通常开始显现症状,而且他们通常不会存活超过5岁。MLD本身能在儿童中出现 (少年形式),其中年龄约在3-10岁的受感染儿童通常显示认知缺损,而寿命可变化 (例如,在症状发作之后10-15年的范围)。MLD本身能在成年人中出现 (成年发作形式),并且能出现任何年龄的个体中 (例如,通常在16岁和更大岁数),而且疾病的进展可变化很大。

[0007] 酶替代疗法 (ERT) 是用于治疗MLD的改善的疗法,其包括向具有MLD的患者施用外源性替代ASA酶,特别是重组芳基硫酸酯酶A (rASA) (例如,重组人芳基硫酸酯酶A (rhASA))。

概述

[0009] 本发明尤其提供用于纯化重组产生、用于酶替代疗法的ASA蛋白的改良方法。本发明部分基于出人意料的发现:使用包括色谱柱后超滤/渗滤仅一个步骤的工艺,重组ASA蛋白可从未经处理的生物材料 (例如,含有ASA的细胞培养基) 中纯化,得到直接进入最终配制缓冲液的药学上可接受的药用物质。如在以下实施例中所描述,通过简单合并色谱步骤的洗脱液和调节合并的洗脱液的pH到约6.0来完成该单一步骤UF/DF工艺。在本发明之前,用于纯化重组产生的rASA蛋白的工艺包括色谱柱后超滤/渗滤 (UF/DF) 至少两个步骤。如在实施例部分所描述,与使用多个UF/DF步骤纯化的重组ASA蛋白相比,根据本发明使用一步骤UF/DF工艺纯化的重组ASA蛋白具有可比较的纯度、活性和产率。例如,根据本发明纯化的重组ASA酶仅具有100pg/mg宿主细胞 (Host Cell) DNA,且保持高比活性 (例如,约50-140U/mg),其他区别特征还在于可提高重组ASA蛋白的生物利用度和/或溶酶体靶向。因此,该简化工艺在纯化重组ASA蛋白中更快速、更便宜、且同等有效。当联合高装载容量色谱步骤时,该工艺特别适用,从而便于重组ASA蛋白的大规模生产。

[0010] 因此,一方面,本发明提供纯化重组芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白的方法,该方法包括以下步骤:通过进行一个或多个色谱步骤由不纯制品中纯化所述重组芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白;合并来自所述一个或多个色谱步骤的洗脱液;调节所述合并的洗脱液的pH到约5.8、5.9或6.0或大于约5.8、5.9或6.0;和使所述经调节pH的洗脱液进行超滤和/或渗滤。在一些实施方案中,将所述pH调节到约5.8-7.0(例如,约5.8-6.8、约5.8-6.6、约5.8-6.4、约5.8-6.2、约5.8-6.1、约5.8-6.0、约5.9-7.0、约5.9-6.8、约5.9-6.6、约5.9-6.4、约5.9-6.2、约5.9-6.1、约5.9-6.0、约5.95-6.20、约5.95-6.15、约5.95-6.10或约5.95-6.05)。在一些实施方案中,将所述pH调节到约6.0。

[0011] 在一些实施方案中,使用pH 7.0的包含磷酸钠、氯化钠和柠檬酸钠的缓冲液来调节所述pH。在一些实施方案中,所述缓冲液包含约0.1-0.5M(例如,约0.1-0.4M、0.1-0.3M、0.2-0.4M或0.2-0.3M)磷酸钠、约0.5-2.5M(例如,约0.5-2.0M、0.5-1.5M、0.75-2.5M、0.75-2.0M、0.75-1.5M、1.0-2.5M、1.0-2.0M或1.0-1.5M)氯化钠和约0.1-0.6M(例如,约0.1-0.5M、0.1-0.4M、0.2-0.5M、0.2-0.4M、0.3-0.5M或0.3-0.4M)柠檬酸钠,所述缓冲液的pH为约7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。在一些实施方案中,所述缓冲液包含约0.25M磷酸钠、约1.33M氯化钠和约0.34M柠檬酸钠,所述缓冲液的pH为约7.0。

[0012] 在一些实施方案中,在所述超滤和渗滤步骤之前进行病毒过滤。在一些实施方案中,进行所述超滤和/或渗滤的单一步骤。在一些实施方案中,所述超滤和/或渗滤的单一步骤仅包括一次渗滤。在各个实施方案中,所述超滤为切向流超滤。

[0013] 在一些实施方案中,所述一个或多个色谱步骤包括阳离子交换色谱。在一些实施方案中,所述阳离子交换色谱是最后的色谱步骤以及在调节pH之前合并所述阳离子交换色谱的洗脱液。在一些实施方案中,在进行所述阳离子交换色谱之前进行阴离子交换色谱、混合模式色谱和疏水相互作用色谱中的一种或多种。

[0014] 在一些实施方案中,所述一个或多个色谱步骤包括亲和色谱。在一些实施方案中,所述亲和色谱为第一色谱步骤。在一些实施方案中,所述亲和色谱是最后的色谱步骤以及在调节pH之前合并所述亲和色谱的洗脱液。在一些实施方案中,在进行所述亲和色谱之前进行阴离子交换色谱、混合模式色谱和疏水相互作用色谱中的一种或多种。在一些实施方案中,在进行所述亲和色谱之后进行阴离子交换色谱、混合模式色谱和疏水相互作用色谱的一种或多种。

[0015] 在一些实施方案中,所述阴离子交换色谱为Q色谱。在一些实施方案中,所述阴离子交换色谱包括TMAE树脂(例如,FRAC TOGEL® TMAE)。在一些实施方案中,一旦装载不纯制品,则使用pH约7.0、包含MES-Tris的第一洗涤缓冲液来洗涤所述TMAE树脂。在某些实施方案中,所述第一洗涤缓冲液包含约20-75mM MES-Tris(例如,约30-60mM、40-70mM或40-60mM)。在某些实施方案中,所述第一洗涤缓冲液包含约20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM或75mM MES-Tris。

[0016] 在一些实施方案中,使用pH约7.0、包含MES-Tris和NaCl的第二洗涤缓冲液来洗涤所述TMAE树脂。在一些实施方案中,所述第二洗涤缓冲液包含约5-75mM MES-Tris(例如,约5-70mM、5-60mM、5-50mM、5-40mM、5-30mM、10-60mM、10-50mM、10-40mM、10-30mM或15-25mM)和约50-150mM NaCl(例如,约50-140mM、50-130mM、50-120mM、50-110mM、75-150mM、75-140mM、75-130mM、75-120mM或75-110mM),所述第二洗涤缓冲液的pH为约7.0。在一些实施方

案中,所述第二洗涤缓冲液包含约5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM或75mM MES-Tris和约50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM或150mM NaCl,所述第二洗涤缓冲液的pH为约7.0。在一些实施方案中,所述第二洗涤缓冲液包含约20mM MES-Tris和约100mM NaCl,所述第二洗涤缓冲液的pH为约7.0。

[0017] 在一些实施方案中,一旦装载不纯制品,则使用pH约7.0、包含MES-Tris和NaCl的洗脱缓冲液来洗脱所述TMAE树脂。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液包含约5-75mM MES-Tris(例如,约5-70mM、5-60mM、5-50mM、5-40mM、约5-30mM、10-75mM、10-60mM、10-50mM、10-40mM或10-30mM)和约150-300mM NaCl(例如,约150-250mM、约180-260mM、约200-280mM、200-260mM、200-240mM、210-300mM、210-280mM、210-260mM或210-240mM),所述洗脱缓冲液的pH为约7.0。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液包含约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM或75mM MES-Tris和约150mM、180mM、200mM、210mM、220mM、230mM、240mM、250mM、260mM、270mM、280mM、290mM或300mM NaCl,所述洗脱缓冲液的pH为约7.0。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液包含约20mM MES-Tris和约220mM NaCl,所述洗脱缓冲液的pH为约7.0。

[0018] 在一些实施方案中,所述阴离子交换色谱利用选自以下组成的组的色谱柱:Q SEPHAROSE™快速流柱、Q SEPHAROSE™高性能柱、Q SEPHAROSE™ XL、CAPTO™ Q、DEAE、TOYOPEARL GIGACAP®Q、FRACTOGEL®TMAE、ESHMUNO™ Q、NUVI A™ Q或UNOSPHERE™ Q。

[0019] 在一些实施方案中,用于本发明的合适混合模式色谱为羟磷灰石(HA)色谱。

[0020] 在一些实施方案中,用于本发明的合适疏水相互作用色谱为苯基色谱。

[0021] 在一些实施方案中,以如下顺序进行阴离子交换色谱(例如,使用TMAE树脂)、混合模式色谱(例如,HA色谱)、疏水相互作用色谱(例如,苯基色谱)和阳离子交换色谱(例如,SP色谱)。

[0022] 在一些实施方案中,用于本发明的合适亲和色谱利用抗芳基硫酸酯酶A抗体(例如,抗人芳基硫酸酯酶A抗体)。

[0023] 在一些实施方案中,合适的阴离子交换色谱使用具有大于约4.5g/L(例如,大于约5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L或15g/L)装载容量的柱。在一些实施方案中,合适的阴离子交换色谱使用具有范围介于约4.5-20g/L之间(例如,范围介于约5-20g/L、5-19g/L、5-18g/L、5-17g/L、5-16g/L、5-15g/L、7.5-20g/L、7.5-19g/L、7.5-18g/L、7.5-17g/L、7.5-16g/L、7.5-15g/L、10-20g/L、10-19g/L、10-18g/L、10-17g/L、10-16g/L或10-15g/L之间)装载容量的柱。在特定的实施方案中,柱的合适装载容量为约10-15g/L。

[0024] 在一些实施方案中,所述不纯制品的超滤在所述一个或多个色谱步骤之前进行。在一些实施方案中,适合于本发明的超滤步骤为切向流超滤。在某些实施方案中,合适的超滤使用膜过滤器,所述膜过滤器包括具有至少约10kDA、至少约20kDA、至少约30kDA、至少约40kDA、至少约50kDA分子量截留的孔径。在某些实施方案中,至少75%的所述重组ASA保留在不纯制品中。在某些实施方案中,至少75%的所述重组ASA渗透过过滤器。在某些实施方案中,合适的超滤步骤利用聚醚砜或纤维素膜。

[0025] 在一些实施方案中,不纯制品的澄清在不纯制品的超滤之前进行。在一些实施方案中,适合于本发明的澄清步骤是使用一种或多种深度过滤器进行过滤。在某些实施方案中,使用一系列深度过滤器来进行不纯制品的过滤。在某些实施方案中,合适深度过滤器系

列利用包括纤维素、硅藻土、聚醚砜或其组合的膜。

[0026] 在一些实施方案中,所述超滤之后为深度过滤和/或病毒灭活的一个或多个步骤。在一些实施方案中,所述深度过滤和/或病毒灭活的一个或多个步骤之后为一个或多个色谱步骤。在一些实施方案中,所述病毒灭活的步骤包括将去污剂加入不纯制品。

[0027] 在一些实施方案中,根据本发明的方法可用于纯化重组ASA蛋白,通过在悬浮液中培养的哺乳动物细胞来制备所述重组ASA蛋白。在一些实施方案中,将所述哺乳动物细胞在生物反应器中培养。在一些实施方案中,所述培养基基于血清。在一些实施方案中,所述培养基无血清。在一些实施方案中,所述无血清培养基为化学成分确定的培养基。

[0028] 在一些实施方案中,所述不纯制品为来自灌注生物反应器的进料流。在一些实施方案中,所述不纯制品由培养基(例如,基于血清或者无血清)制备,所述培养基含有由哺乳动物细胞分泌的重组ASA蛋白。在一些实施方案中,所述不纯制品从冷冻的培养基制品中解冻。

[0029] 在一些实施方案中,所述超滤和/或渗滤的步骤包括将经纯化的重组ASA蛋白交换进入药物配制缓冲液。

[0030] 在一些实施方案中,所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,根据本发明的经纯化的重组ASA蛋白含有小于约150ng/mg、140ng/mg、130ng/mg、120ng/mg、110ng/mg、100ng/mg、90ng/mg、80ng/mg、70ng/mg、60ng/mg、50ng/mg、40ng/mg、30ng/mg、20ng/mg或10ng/mg宿主细胞蛋白(Host Cell Protein)(HCP)。

[0032] 在一些实施方案中,当使用考马斯亮蓝染色法(Coomassie Blue staining)进行SDS-PAGE时,所述经纯化的重组ASA蛋白没有大于1.0%测定法对照强度的新谱带。

[0033] 在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于约150pg/mg、140pg/mg、130pg/mg、120pg/mg、110pg/mg、100pg/mg、90pg/mg、80pg/mg、70pg/mg、60pg/mg、50pg/mg、40pg/mg、30pg/mg、20pg/mg或10pg/mg宿主细胞DNA。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供纯化重组芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:通过进行一个或多个色谱步骤由不纯制品中纯化所述重组芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白,其中所述第一色谱步骤使用约4.5g蛋白/L树脂(例如,大于约5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L或20g/L)或大于约4.5g蛋白/L树脂(例如,大于约5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L或20g/L)的装载容量的柱;合并来自所述一个或多个色谱步骤的洗脱液;调节所述合并的洗脱液的pH到约6.0或大于约6.0的pH;和使所述经调节pH的洗脱液进行超滤和/或渗滤。

[0035] 在一些实施方案中,其中进行一个或多个色谱步骤的步骤包括以如下顺序进行:第一离子交换色谱、混合模式色谱、疏水相互作用色谱和阳离子交换色谱。

[0036] 在一些实施方案中,所述一个或多个色谱步骤包括亲和色谱。在某些实施方案中,所述亲和色谱在所述第一离子交换色谱步骤之前进行。在某些实施方案中,所述亲和色谱在所述第二离子交换色谱步骤之后进行。在一些实施方案中,所述亲和色谱在介于所述第一离子交换色谱步骤和所述第二离子交换色谱步骤之间进行。

[0037] 在一些实施方案中,进行一个或多个色谱步骤的步骤包括以如下顺序进行:阴离子交换色谱、混合模式色谱、疏水相互作用色谱和阳离子交换色谱。

[0038] 在一些实施方案中,进行一个或多个色谱步骤的步骤包括以如下顺序进行:亲和色谱、阴离子交换色谱、混合模式色谱、疏水相互作用色谱和阳离子交换色谱。

[0039] 在一些实施方案中,进行一个或多个色谱步骤的步骤包括以如下顺序进行:阴离子交换色谱、混合模式色谱、疏水相互作用色谱、阳离子交换色谱和亲和色谱。

[0040] 在一些实施方案中,所述阴离子交换色谱使用具有TMAE树脂的柱。在某些实施方案中,所述TMAE柱具有约5-20g蛋白/L树脂(例如,约5-19g/L、5-18g/L、5-17g/L、5-16g/L、5-15g/L、7.5-20g/L、7.5-19g/L、7.5-18g/L、7.5-17g/L、7.5-16g/L、7.5-15g/L、10-20g/L、10-19g/L、10-18g/L、10-17g/L、10-16g/L或10-15g/L)的装载容量。

[0041] 在一些实施方案中,所述超滤和/或渗滤的单一步骤在所述一个或多个色谱步骤之后进行。

[0042] 此外,本发明提供根据本文所述的本发明方法纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白和包含其的药物组合物。

[0043] 在一些实施方案中,本发明提供包含经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 的组合物,所述经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 具有与SEQ ID NO:1至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列,其中所述经纯化的重组ASA具有至少约50U/mg的比活性,又其中所述经纯化的重组ASA含有小于150ng/mg宿主细胞蛋白 (HCP) 和/或150pg/mg宿主细胞DNA (HCD)。在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA含有小于约140ng/mg、130ng/mg、120ng/mg、110ng/mg、100ng/mg、90ng/mg、80ng/mg、70ng/mg、60ng/mg、50ng/mg、40ng/mg、30ng/mg、20ng/mg或10ng/mg宿主细胞蛋白 (HCP)。在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA含有小于约140pg/mg、130pg/mg、120pg/mg、110pg/mg、100pg/mg、90pg/mg、80pg/mg、70pg/mg、60pg/mg、50pg/mg、40pg/mg、30pg/mg、20pg/mg或10pg/mg宿主细胞DNA。

[0044] 在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA具有至少约50U/mg、60U/mg、70U/mg、80U/mg、90U/mg、100U/mg、110U/mg、120U/mg、130U/mg、140U/mg的比活性。在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA具有范围为约50-200U/mg (例如,约50-190U/mg、50-180U/mg、50-170U/mg、50-160U/mg、50-150U/mg、50-140U/mg、50-130U/mg、50-120U/mg、50-110U/mg、50-100U/mg、60-140U/mg、60-130U/mg、60-120U/mg、60-110U/mg、60-100U/mg、70-140U/mg、70-130U/mg、70-120U/mg、70-110U/mg、70-100U/mg、80-140U/mg、80-130U/mg、80-120U/mg、80-110U/mg、80-100U/mg、90-140U/mg、90-130U/mg、90-120U/mg、90-110U/mg、90-100U/mg、100-140U/mg、100-130U/mg、100-120U/mg、100-110U/mg、110-140U/mg、110-130U/mg、110-120U/mg、120-140U/mg、120-130U/mg或130-140U/mg)的比活性。

[0045] 在一些实施方案中,本发明提供包含经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 的组合物,所述经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 具有与SEQ ID NO:1至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列,其中所述经纯化的ASA的特征在于包括一个或多个峰值基团的聚糖图谱,所述峰值基团选自指示中性(峰值基团1)、一唾液酸化(峰值基团2)、封端的甘露糖-6-磷酸化(峰值基团3)、二唾

液酸化(峰值基团4)、一甘露糖-6-磷酸化(峰值基团5)、杂化(峰值基团6)和二甘露糖-6-磷酸化(峰值基团7)的峰值基团。在一些实施方案中,所述经纯化的ASA的特征在于包括峰值基团1-7的至少两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个或者七个或更多个的聚糖图谱。在一些实施方案中,所述经纯化的重组ASA具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,本发明提供包含本文所述组合物和生理上可接受的载体的制剂。在一些实施方案中,所述制剂适合静脉内施用。在一些实施方案中,所述制剂适合鞘内施用。在一些实施方案中,所述制剂适合皮下施用。

[0047] 此外,本发明提供治疗异染性脑白质营养不良疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用经纯化的重组ASA蛋白、药物组合物或者本文所述的制剂。

[0048] 如本文所使用,除非另有明确说明,术语“ASA蛋白”、“ASA”、“ASA酶”或语法等同成分是指重组ASA蛋白分子的制品。

[0049] 如在本申请中所使用,术语“约”和“大约”等同使用。在本申请中使用有或没有约/大约的任何数值均意在覆盖通过相关领域普通技术人员所理解的任何正常波动。

[0050] 本发明的其他特征、目的和优势在后续详细描述中均明显。然而,应当理解,尽管详细描述说明本发明的实施方案,但它仅以示意性方式给出,而非限制。在本发明范围内的各种变化和修改对于详细描述的那些熟练技术人员来说均很显而易见。

附图简述

[0052] 一起构成附图的下述图仅用于示意目的,而非限制。

[0053] 图1示出示例性纯化工艺的整体流程图。

[0054] 图2示出包括合并阳离子交换柱的洗脱液和调节合并的洗脱液pH步骤的示例性纯化工艺的整体流程图。

[0055] 图3示出说明每个膜的进料流速、跨膜压力(TMP)和渗透通量之间相互关系的示例性结果。

[0056] 图4示出在整个工艺中Fractogel和Q FF显示相似谱带轮廓的示例性SDS-PAGE(银色)凝胶。

[0057] 图5示出示例性结果,该结果显示包括单一UFDF或UFDFDF步骤的可行性运行和对照运行表现出与参比标准品(泳道3)类似的谱带图案,这表明来自所有运行的药用物质均表现出可相比较的低水平的HCP。

[0058] 图6示出示例性结果,该结果证实在实验(可行性)和对照运行与参比标准品之间的可比性,并且通过SDS-PAGE(Coomassie)未检测到另外的谱带图案。

[0059] 定义

[0060] 为了使本发明更容易理解,首先定义某些术语如下。以下术语和其他术语的另外定义贯穿说明书来阐述。

[0061] 大约或约:如本文所使用,如应用到所关注的一个或多个值的术语“大约”或“约”是指类似于规定参考值的值。在某些实施方案中,除非另有说明或者由上下文明显可见,术语“大约”或“约”是指任一方向(大于或小于)落入规定参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或

更小内的一系列值(除这些数值会超过可能值100%的情况外)。

[0062] 生物活性:如本文所使用,措辞“生物活性”是指在生物系统、特别是在有机体中具有活性的任何试剂的特性。例如,当向有机体施用,认为对有机体具有生物效应的试剂为生物活性。在特定的实施方案中,在蛋白或多肽为生物活性的情况下,共有该蛋白或多肽的至少一种生物活性的蛋白或多肽部分通常称为“生物活性”部分。

[0063] 非阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR)(Cation-independent mannose-6-phosphate receptor(CI-MPR)):如本文所使用,术语“非阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR)”是指在注定要运输到溶酶体的高尔基体中在酸性水解酶前体上结合甘露糖-6-磷酸(M6P)标签的细胞受体。除了甘露糖-6-磷酸之外,CI-MPR也结合包括IGF-II的其他蛋白。CI-MPR也称为“M6P/IGF-II受体”、“CI-MPR/IGF-II受体”、“IGF-II受体”或“IGF2受体”。这些术语及其缩写在本文中可交换使用。

[0064] 色谱法:如本文所使用,术语“色谱法”是指分离混合物的技术。通常,混合物溶解在称为“流动相”的流体中,该流体携带它通过容纳称为“固定相”的另一材料的结构。柱色谱是固定床在管子(即,柱)内的分离技术。

[0065] 稀释剂:如本文所使用,术语“稀释剂”是指用于制备重新组成的制剂的药学上可接受的(例如,用于向人施用安全和无毒)稀释物质。示例性稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0066] 洗脱:如本文所使用,术语“洗脱”是指使用溶剂通过洗涤由一种材料中提取另一种材料的过程。例如,在离子交换色谱中,洗脱是洗涤装载的树脂以去除捕获的离子的过程。

[0067] 洗脱液:如本文所使用,术语“洗脱液”是指流动相“载体”和由色谱中出现的分析物材料的组合,通常是洗脱的结果。

[0068] 酶替代疗法(ERT):如本文所使用,术语“酶替代疗法(ERT)”是指通过提供缺失酶来纠正酶缺陷的任何治疗策略。一旦施用,酶就会被细胞吸收和运输到溶酶体,在此酶用于消除由于酶缺陷在溶酶体中累积的材料。通常,对于有效的溶酶体酶替代疗法,将治疗酶递送到显示储存缺陷的靶组织合适细胞中的溶酶体处。本文所述的纯化工艺可用于纯化和配制作MLD的ERT药用物质的重组芳基硫酸酯酶A。

[0069] 使平衡或平衡:如本文所使用,与色谱相关的术语“使平衡”或“平衡”是指使第一流体(例如,缓冲液)与另一流体进入平衡,通常达到流体(例如,缓冲液)组分稳定和均衡分配。例如,在一些实施方案中,通过使一个或多个柱体积的所需流体(例如,缓冲液)通过柱可平衡色谱柱。

[0070] 改善、增加或减少:如本文所使用,术语“改善”、“增加”或“减少”或语法等同成分指示与基线测量值(例如在本文所述治疗开始之前在相同个体中测量值或者缺乏本文所述治疗在对照个体(或多个对照个体)中测量值)相关的值。“对照个体”是等待治疗个体一样患有相同形式的溶酶体贮积病的个体,他们与等待治疗个体年龄相仿(以确保在等待治疗个体和对照个体中疾病阶段相当)。

[0071] 杂质:如本文所使用,术语“杂质”是指内部有限量的液体、气体或固体物质,它们与靶材料或化合物的化学组分不同。杂质也称为污染物。

[0072] 装载:如本文所使用,术语“装载”是指在色谱中添加含有样品的液体或固体到柱

中。在一些实施方案中,当装载的样品通过柱时,则将装载在柱上的样品特定组分捕获。在一些实施方案中,当装载的样品通过柱时,装载在柱上的样品特定组分未被柱捕获或者未“流过”柱。

[0073] 多肽:如本文所使用,通常而言,“多肽”是通过肽键彼此相互连接的至少两个氨基酸串。在一些实施方案中,多肽可包括至少3-5个氨基酸,每个氨基酸通过至少一个肽键的方式连接到其他氨基酸。本领域普通技术人员理解,多肽有时包括“非天然”氨基酸或者其他实体,但是它们仍然能够任选整合进入多肽链。

[0074] 合并:如本文所使用,与色谱相关的术语“合并(pool)”是指结合在一起通过柱的流体一个或多个部分。例如,在一些实施方案中,可将含有通过色谱分离的样品所需组分的一个或多个部分(例如,“峰部分”)合并到一起,得到单一“合并的”部分。

[0075] 替代酶:如本文所使用,术语“替代酶”是指在待治疗的疾病中可用作至少部分替代缺乏或缺失酶的任何酶。在一些实施方案中,术语“替代酶”是指在待治疗的溶酶体贮积病中可用作至少部分替代缺乏或缺失溶酶体酶的任何酶。在一些实施方案中,替代酶(例如,rASA)能够减少在哺乳动物溶酶体中累积的物质或者能够解救或减缓一个或多个溶酶体贮积病(例如,MLD)症状。适合于本发明的替代酶包括野生型或修饰型溶酶体酶,并且可使用重组和合成方法产生或者由天然来源纯化。替代酶可以为重组酶、合成酶、基因激活的酶或者天然酶。

[0076] 可溶的:如本文所使用,术语“可溶的”是指治疗剂形成均质溶液的能力。在一些实施方案中,在将治疗剂施用进入和运输到作用靶位点的溶液中治疗剂的溶解性足够使得可递送治疗有效量的治疗剂到作用靶向的位点。多个因素可影响治疗剂的溶解性。例如,可影响蛋白溶解性的相关因素包括离子强度、氨基酸序列和其他辅助加溶剂或盐(例如,钙盐)的存在。在一些实施方案中,根据本发明的治疗剂可溶解在其对应的药物组合物中。

[0077] 稳定性:如本文所使用,术语“稳定的”是指治疗剂(例如,重组酶)在延长时间段内维持它的治疗功效(例如,其全部或者大部分预期生物活性和/或生理化学完整性)的能力。可预估在延长时间段内(例如,至少1、3、6、12、18、24、30、36个月或更久)治疗剂的稳定性和药物组合物维持这些治疗剂稳定性的能力。在制剂的上下文中,稳定的制剂是在储存和加工(例如冷冻/解冻、机械混合和冻干)过程中基本上保持其中治疗剂的物理和/或化学完整性和生物活性的一种制剂。对于蛋白稳定性,可通过高分子量(HMW)聚集体形成、酶活性损耗、肽片段生成和电荷曲线的变化来测定。

[0078] 病毒处理:如本文所使用,术语“病毒处理”是指“病毒去除”,将其中的病毒简单地从样品中去除(例如病毒过滤)或者“病毒灭活”,其中的病毒仍然保留在样品中,但是为非感染性形式。在一些实施方案中,病毒去除可利用纳米过滤和/或色谱技术等。在一些实施方案中,病毒灭活尤其可利用溶剂灭活、去污剂灭活、巴氏消毒法、酸性pH灭活、和/或紫外线灭活。

详述

[0080] 此外,本发明提供用于纯化ASA蛋白的改善的方法,该ASA蛋白通过重组产生、用于酶替代疗法。在一些实施方案中,本发明提供使用包括色谱柱后超滤/渗滤仅一个步骤的工艺来由不纯制品(例如,未经处理的生物材料,例如含ASA的细胞培养基)纯化重组ASA蛋白

的方法。在一些实施方案中,通过合并色谱步骤的洗脱液和调节合并的洗脱液的pH到约6.0或大于约6.0来完成该单一步骤UF/DF工艺。在一些实施方案中,将该简化工艺与高装载容量色谱步骤合并以便于重组ASA蛋白的大规模生产。

[0081] 本发明的各个方面进一步详细描述在以下小节中。小节的使用不是旨在限制本发明。每一小节可应用到本发明的任何方面。在本申请中,除非另有说明,“或”的使用是指“和/或”。

[0082] 芳基硫酸酯酶A

[0083] 芳基硫酸酯酶A (ASA、ARSA或脑苷脂-硫酸酯酶) 是将脑苷脂-3-硫酸酯(或硫苷脂) 分解为脑苷脂和硫酸盐的酶。具体而言,半乳糖基硫苷脂正常通过溶酶体酶芳基硫酸酯酶A (EC 3.1.6.8) (Austin等人,Biochem J.1964,93,15C-17C) 和称为皂化蛋白(saposin) B的鞘脂激活蛋白的联合作用来水解3-O-硫酸酯键以形成半乳糖脑苷脂而加以代谢。芳基硫酸酯酶A的缺乏在具有婴儿后期、少年和成年形式的异染性脑白质营养不良 (MLD) 患者的全部组织中均存在。如本文所使用,芳基硫酸酯酶A蛋白将称作“ASA”或“ARSA”,而皂化蛋白B将称作“Sap-B”。

[0084] 芳基硫酸酯酶A是具有低等电点的酸性糖蛋白。在pH 6.5下,酶作为分子量大约100kDa的单体存在。在酸性条件 (pH \leq 约5.0) 下,ASA作为480kDa八聚合体存在,而在中性pH水平下分解为二聚体。在人尿中,酶由63和54kDa两个非全同亚单位组成 (Laidler PM等人,Biochim Biophys Acta.1985,827,73-83)。由人肝、胎盘和成纤维细胞纯化的芳基硫酸酯酶A也由大小略微不同的介于55和64kDa之间变化的两个亚单位组成 (Draper RK等人,Arch Biochemica Biophys.1976,177,525-538;Waheed A等人,Hoppe Seylers Z Physiol Chem.1982,363,425-430;Fujii T等人,Biochim Biophys Acta.1992,151122,93-98)。如同其他溶酶体酶,芳基硫酸酯酶A在膜结合核糖体上作为糖基化前体合成。这种糖基化前体随后穿过内质网和高尔基体,在其中糖基化前体的N-连接寡糖得到加工,形成磷酸化和硫酸化的复合型寡糖 (Waheed A等人,Biochim Biophys Acta.1985,847,53-61;Braulke T等人,Biochem Biophys Res Commun.1987,143,178-185)。在正常培养的成纤维细胞中,产生62kDa的前体多肽,该前体多肽通过甘露糖-6-磷酸受体结合作用而易位 (Braulke T等人,J Biol Chem.1990,265,6650-6655) 到酸性前溶酶体内体 (Kelly BM等人,Eur J Cell Biol.1989,48,71-78)。

[0085] 本文所述的方法可用于由任何来源中纯化芳基硫酸酯酶A,例如由组织或培养的细胞(例如,重组产生芳基硫酸酯酶A的人细胞(例如,成纤维细胞))。通过本文所述的方法可产生包括但不限于人和其他动物的任何来源的芳基硫酸酯酶A。

[0086] 人芳基硫酸酯酶A信号肽的长度(18个氨基酸) 以共有序列和信号序列的特异性加工位点为基础。因此,对来自推导性人ASA cDNA (EMBL基因库登录号J04593和X521151),该信号肽的切割应当在全部细胞中在残基编号18(A1a) 之后进行,产生成熟形式的人芳基硫酸酯酶A。如本文所使用,重组芳基硫酸酯酶A将缩写成“rASA”。成熟形式的芳基硫酸酯酶A(包括成熟形式的人芳基硫酸酯酶A) 将称作“mASA”,而成熟重组人ASA将称作“mrhASA”。

[0087] 芳基硫酸酯酶A的多种形式已经在来自人尿 (Luijten JAFM等人,J Mol Med.1978,3,213)、白细胞 (Dubois等人,Biomedicine.1975,23,116-119;Manowitz P等人,Biochem Med Metab Biol.1988,39,117-120)、血小板 (Poretz等人,Biochem J.1992,287,

979-983)、培养的成纤维细胞(Waheed A等人,Hoppe Seylers Z Physiol Chem.1982,363,425-430;Stevens RL等人,Biochim Biophys Acta.1976,445,661-671;Farrell DF等人,Neurology.1979,29,16-20)和肝脏(Stevens RL等人,Biochim Biophys Acta.1976,445,661-671;Farrell DF等人,Neurology.1979,29,16-20;Sarafian TA等人,Biochem Med.1985,33,372-380)的酶制品的电泳和等电点聚焦上证实。使用内切糖苷酶H、唾液酸酶和碱性磷酸酶的处理降低分子大小和电泳图案的复杂性,这表明芳基硫酸酯酶A的大量电荷不均匀性归因于该酶的碳水化合物含量变化。

[0088] 芳基硫酸酯酶A的活性位点包含必需的组氨酸残基(Lee GD和Van Etten RL,Arch Biochem Biophys.1975,171,424-434)和两个或多个精氨酸残基(James GT,Arch Biochem Biophys.1979,97,57-62)。毫摩尔范围或更低浓度下的许多阴离子是酶的抑制品。

[0089] 已经描述人芳基硫酸酯酶A基因结构。如本文所使用,该基因将称作“ARSA”。然而,在一些情况下,“ARSA”也可称为芳基硫酸酯酶A蛋白。ARSA基因位于染色体22的长臂末端附近(22q13.31-qter),它跨越3.2kb(Kreysing等人,Eur J Biochem.1990,191,627-631)以及由规定507个氨基酸酶单位的八个外显子组成(Stein等人,J Biol Chem.1989,264,1252-1259)。在成纤维细胞中已经检测到2.1、3.7和4.8kb的信使RNA,其中2.1-kb信息显然源于通过细胞生成的大量活性芳基硫酸酯酶A(Kreysing等人,Eur J Biochem.1990,191,627-631)。ARSA序列已经以登录号X521150保存在EMBL基因库。通过Kreysing等人(Eur J Biochem.1990,191,627-631)描述公开的cDNA和ARSA的编码部分之间的差别。最初由Stein等人(J Biol Chem.1989,264,1252-1259)描述的cDNA序列和由Kreysing等人(Eur J Biochem.1990,191,627-631)描述的cDNA序列分别以以下登录号J04593和X521151保存在EMBL基因库。

[0090] 在ARSA基因中已经识别数种多态现象和超过40种疾病相关的突变(Gieselmann等人,Hum Mutat.1994,4,233-242;Barth等人,Hum Mutat.1995,6,170-176;Draghia等人,Hum Mutat.1997,9,234-242)。在ARSA基因中疾病相关的突变可分为与MLD的临床表型十分相关的两大组。一组(I)不产生活性酶、无免疫反应性蛋白,并且当将其引入培养的动物细胞系时,不会表达ASA活性。另一组(A)在培养的细胞中生成少量的交叉反应物质和低水平的功能酶。与组(I)突变纯化的个体或者由该组具有两种不同突变的个体表达为婴儿后期MLD。具有一组(I)-型和一组(A)-型突变的大部分个体发展为少年发作形式,而具有两组(A)-型突变的那些个体通常出现成年MLD。已经发现一些突变相当频繁出现,而其他突变则仅在某一家族中检测到。可以通过许多家族成员追踪具体突变,但是普遍的携带者筛查还不可行。

[0091] 除了上述疾病相关的突变之外,在ARSA基因中已经识别多种多态现象。在MLD患者的一些临床上正常双亲以及也在普通人群中发现极低的ASA活性。该所谓的假缺乏ASA与ARSA基因的常见多态现象相关(Gieselmann等人,Dev Neurosci.1991,13,222-227)。

[0092] 重组ASA蛋白

[0093] 如本文所使用,术语“重组ASA蛋白”是指可置换天然存在的芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白的至少部分活性或者解救与ASA缺乏相关的一个或多个表型或症状的任何分子或部分分子。如本文所使用,术语“重组ASA酶”和“重组ASA蛋白”和语法等同成分可交换使用。在一些实施方案中,本发明用于纯化重组ASA蛋白,该重组ASA蛋白为具有与成熟人ASA蛋白基

本相似或同一氨基酸序列的多肽。

[0094] 通常,人ASA作为前体分子产生,该前体分子被加工为成熟形式。该过程通常通过去除18个氨基酸信号肽来发生。通常,前体形式也称为全长前体或全长ASA蛋白,它含有507个氨基酸。切割N-末端18个氨基酸,得到长度为489个氨基酸的成熟形式。因此,预估该N-末端18个氨基酸通常不是ASA蛋白活性所需要的。典型野生型或天然存在的人ASA蛋白的成熟形式(SEQ ID NO:1)和全长前体(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列显示在表1中。

[0095] 表1.人芳基硫酸酯酶A

成熟形式	RPPNIVLIFADDLGYDGLGCGHPSSTTNNLDQLAAGGLRFTDFYFVPSLCTPS RAALLTGRLPVRMGMPGVLPSSRGGLPLEEVTVAEVLAAARGYLTGMAGKWHL GVGPEGAFLLPPHQGFHRLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPI LLANLSVEAQPPWLPGLLEARYMAFAHDLMAAQRQDRFFLYYASHHHTYPQFS GQSFAERSGRGPFPGDSLMELEDAVGTLMTAIGDLGLEETLVIFTADNGPETMR MSRGGCSGLLRGCGKTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAA LAGAPLPNVTLDGFDLSPLLGTGKSPRQSLFFYPSPDEVRGVFAVRTGKYKA HFFTQGSASHSDTTADPACHASSSLTAHEPFLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATP EVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPD PHA (SEQ ID NO:1)
全长前体	MGAPRSLLLAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYDGLGCGHPSSTTNNLDQLAA GGLRFTDFYFVPSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMPGVLPSSRGGLPLEEVTVA EVLAAARGYLTGMAGKWHLGVGPEGAFLLPPHQGFHRLGIPYSHDQGPCQNLTCF PPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLLEARYMAFAHDLMAAQRQD RPFLLYASHHHTYPQFSGQSFAERSGRGPFPGDSLMELEDAVGTLMTAIGDLGL LEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGCGKTTYEGGVREPALAFWPGHIAP GVTHELASSLDLLPTLAAAGAPLPNVTLDGFDLSPLLGTGKSPRQSLFFYPSP YDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQGSASHSDTTADPACHASSSLTAHEPFLYDLS KDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQ ICCHPGCTPRPACCHCPDPHA (SEQ ID NO:2)

[0097] 因此,在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白是成熟人ASA蛋白(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白可以为成熟人ASA蛋白的同源物或类似物。例如,成熟人ASA蛋白的同源物或类似物可以为如与野生型或天然存在的ASA蛋白(例如,SEQ ID NO:1)相比含有一个或多个氨基酸置换、缺失和/或插入的修饰型成熟人ASA蛋白,但基本上仍然保持ASA蛋白活性。因此,在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白与成熟人ASA蛋白(SEQ ID NO:1)基本上同源。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白与成熟人ASA蛋白(SEQ ID NO:1)基本上同一。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白含有成熟人ASA蛋白的片段或部分。

[0098] 作为另外一种选择,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白为全长ASA蛋白。在一些实施方案中,重组ASA蛋白可以为全长人ASA蛋白的同源物或类似物。例如,全长人ASA蛋白的同源物或类似物可以为如与野生型或天然存在的全长ASA蛋白(例如,SEQ ID NO:2)相比含有一个或多个氨基酸置换、缺失和/或插入的修饰型全长人ASA蛋白,但基本上仍然保持ASA蛋白活性。因此,在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白与全长人ASA蛋白(SEQ ID NO:2)基本上同源。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同源的氨基酸序列。

在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白与SEQ ID NO:2基本上同一。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,通过本发明的实施方案纯化的重组ASA蛋白含有全长人ASA蛋白的片段或部分。如本文所使用,全长ASA蛋白典型含有信号肽序列。

[0099] 根据本领域普通技术人员已知的改变多肽序列的方法(例如在编制这些方法的参考文献中找到的方法)可制备人ASA蛋白的同源物或类似物。在一些实施方案中,氨基酸的保守置换包括在以下组内氨基酸之间进行的置换:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。在一些实施方案中,“保守氨基酸置换”是指不改变进行氨基酸置换的蛋白的相对电荷或大小特性。

[0100] 在一些实施方案中,重组ASA蛋白可包含在靶细胞的表面上结合受体的部分以促进细胞摄取和/或溶酶体靶向。例如,这些受体可以为结合甘露糖-6-磷酸(M6P)残基的非阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR)。此外,CI-MPR也结合包括IGF-II的其他蛋白。在一些实施方案中,重组ASA蛋白含有在蛋白表面上的M6P残基。尤其,重组ASA蛋白可含有具有对CI-MPR较高结合亲和力的双磷酸化寡糖。在一些实施方案中,合适的酶含有每种酶多达约至少20%双磷酸化寡糖的平均值。在其他实施方案中,合适的酶可含有每种酶约10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%双磷酸化寡糖。

[0101] 在一些实施方案中,可使重组ASA酶融合在靶细胞的表面上能够结合受体的溶酶体靶向部分。合适的溶酶体靶向部分可以为IGF-I、IGF-II、RAP、p97及其变体、同源物或片段(例如,包括与野生型成熟IGF-I、IGF-II、RAP、p97肽序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%同一的序列的那些肽)。可使溶酶体靶向部分在N-末端、C-末端或内部处缀合或融合到ASA蛋白或酶。

[0102] 重组ASA蛋白的产生

[0103] 本发明用于纯化通过各种方法产生的重组ASA蛋白。例如,通过利用工程化以表达编码ASA的核酸的宿主细胞体系可重组产生ASA蛋白。作为另外一种选择,通过激活内源性ASA基因可产生ASA蛋白。据预期,本发明可用于纯化使用各种表达系统产生的重组ASA蛋白。合适的表达系统包括例如鸡蛋、杆状病毒、植物、酵母或哺乳动物细胞。

[0104] 在一些实施方案中,在哺乳动物细胞中产生ASA酶。根据本发明可使用的哺乳动物细胞的非限制性例子包括BALB/c小鼠骨髓瘤系(NS0/1, ECACC No:85110503);成视网膜细胞(PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands);通过SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(在混悬培养物中生长经亚克隆的HEK293或293细胞, Graham等人, J.Gen Virol., 36:59, 1977);人纤维肉瘤细胞系(例如, HT1080);幼仓鼠肾细胞(BHK21, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞+/-DHFR(CHO, Urlaub和Chasin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:4216, 1980);小鼠塞尔托利细胞(sertoli cell)(TM4, Mather, Biol.Reprod., 23:243-251, 1980);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲青猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1 587);人宫颈癌细胞(HeLa, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人, Annals

N.Y.Acad.Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5细胞; FS4细胞; 和人肝癌系 (Hep G2)。

[0105] 在一些实施方案中, 根据本发明的本发明方法用于纯化由人细胞 (例如, HT1080) 中产生的重组ASA酶。在一些实施方案中, 根据本发明的本发明方法用于纯化由CHO细胞产生的重组ASA酶。

[0106] 通常, 经工程化以表达重组ASA的细胞可包含编码本文所述的重组ASA蛋白的转基因。应当理解, 编码重组ASA的核酸可含有调控序列、基因控制序列、启动子、非编码序列和/或用于表达重组ASA的其他合适序列。通常, 编码区可操作连接一个或多个这些核酸组件。

[0107] “调控序列”通常是指位于编码序列的上游 (5' 非编码序列)、内或下游 (3' 非编码序列) 以及影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或者翻译的核苷酸序列。调控序列可包括启动子、翻译前导序列、内含子和聚腺苷酸化识别序列。有时, “调控序列”也称为“基因控制序列”。

[0108] “启动子”通常是指能够控制编码序列或功能RNA表达的核苷酸序列。通常, 编码序列位于启动子序列的3'处。启动子序列由近端和更远端上游元件组成, 后一元件通常称为增强子。因此, “增强子”是能刺激启动子活性和可以为启动子的先天元件或者插入以增强启动子的水平或组织特异性的异源性元件的核苷酸序列。启动子可全部起源于天然基因或者由来源于在自然中发现的不同启动子的不同元件构成, 或者甚至包含合成核苷酸片段。通过本领域技术人员理解, 不同的启动子可引导在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段或者响应不同环境条件的基因的表达。

[0109] “3' 非编码序列”通常是指位于编码序列的下游的核苷酸序列, 以及包括聚腺苷酸化识别序列和编码能够影响mRNA加工或基因表达的调节信号的其他序列。多腺苷酸化信号通常特征为影响聚腺苷酸束 (polyadenylic acid tract) 添加到mRNA前体的3'端上。

[0110] “翻译前导序列”或“5' 非编码序列”通常是指位于基因的启动子序列和编码序列之间的核苷酸序列。翻译前导序列存在于翻译起始序列的完全处理的mRNA上游。翻译前导序列可影响初级转录物处理为mRNA、mRNA稳定性或翻译效率。

[0111] 通常, 术语“可操作性连接”或“可操作连接”是指在单一核酸片段上两个或多个核酸片段的结合, 使得一者的功能受到另一者的影响。例如, 当启动子能够影响编码序列的表达, 它可操作性连接编码序列 (即, 编码序列是在启动子的转录控制下)。编码序列以有义或反义方向可操作性连接调控序列。

[0112] 转基因的编码区可包括一个或多个沉默突变以优化特定细胞类型的密码子使用。例如, ASA转基因的密码子可被优化用于在脊椎动物细胞中表达。在一些实施方案中, ASA转基因的密码子可被优化用于在哺乳动物细胞中表达。在一些实施方案中, ASA转基因的密码子可被优化用于在人细胞中表达。

[0113] 任选地, 构建体可包含另外的组件, 例如以下的一种或多种: 剪接位点、增强子序列、在合适启动子控制下的可选择标志基因、在合适启动子控制下的可扩增标志基因、和基质附着区 (MAR) 或者增强它插入区表达的本领域已知的其他元件。

[0114] 一旦转染或转导进入宿主细胞, 合适的载体可染色体外 (附加型) 表达或者整合进入宿主细胞的基因组。

[0115] 细胞培养基和条件

[0116] 各种细胞培养基和条件可用于产生重组ASA蛋白。例如, 重组ASA蛋白可在含血清

或无血清培养基中产生。在一些实施方案中,重组ASA蛋白在无血清培养基中产生。在一些实施方案中,重组ASA蛋白在无动物培养基(即,没有动物来源的组分的培养基)中产生。在一些实施方案中,重组ASA蛋白在化学成分确定的培养基中产生。如本文所使用,术语“化学成分确定的营养培养基”是指基本上所有化学组分均是已知的培养基。在一些实施方案中,化学成分确定的营养培养基没有动物来源的组分,例如血清、血清来源的蛋白(例如,白蛋白或胎球蛋白)和其他组分。在一些情况下,化学成分确定的培养基包含一种或多种蛋白(例如,蛋白生长因子或细胞因子)。在一些情况下,化学成分确定的营养培养基包含一种或多种蛋白水解产物。在其他情况下,化学成分确定的营养培养基是无蛋白培养基,即,不包含蛋白、未知组合物的水解产物或组分的无血清培养基。

[0117] 在一些实施方案中,化学成分确定的培养基可通过一种或多种动物来源的组分来补充。这些动物来源的组分包括但不限于:胎牛血清、马血清、山羊血清、驴血清、人血清和血清来源的蛋白如白蛋白(例如,牛血清白蛋白或人血清白蛋白)。尽管加入血清是理想的,因为它含有诸如维生素、氨基酸、生长因子和激素的成分,但是它也由可妨碍重组蛋白纯化的外源性蛋白集中来源构成。例如,胎球蛋白是通过细胞、主要为肝细胞分泌和具有三个特性结构域的相关血清蛋白的家族(Brown WM, 等人, Eur J Biochem. 1992年4月1日; 205(1): 321-31)。胎球蛋白在胎儿期丰富,因此,通常在可市售获得的胎儿来源的血清中丰富,并且胎球蛋白构成在纯化中主要蛋白污染物。因此,在一些实施方案中,合适的培养基为无异物(xeno-free)培养基,例如,不含有任何牛血清或牛血清来源组分的培养基。例如,无异物培养基可含有一种或多种人血清白蛋白、人运铁蛋白、人胰岛素和人脂质。在一些实施方案中,合适的培养基含有胎球蛋白耗尽的血清(fetuin-depleted serum)。使用本领域已知的各种方法可从血清中耗尽胎球蛋白。例如,通过抗体亲和色谱可将胎球蛋白由血清中耗尽。(参见,例如, Toroian D和Price PA, Calcif Tissue Int (2008) 82:116-126)。在一些实施方案中,合适的培养基无胎球蛋白。

[0118] 各种细胞培养条件可用于大规模生产重组ASA蛋白,这些细胞培养条件包括但不限于滚瓶培养物,生物反应器的分批培养物和生物反应器的补料分批培养物。在一些实施方案中,通过悬浮培养的细胞来产生重组ASA蛋白。在一些实施方案中,通过粘附细胞来产生重组ASA蛋白。

[0119] 重组芳基硫酸酯酶A的纯化

[0120] 本发明的实施方案包括产生芳基硫酸酯酶A (“ASA”) (特别是重组人ASA (“rhASA”)) 药用物质的纯化工艺。各种技术任选全部或部分联合本文所述修改用于产生经纯化的ASA药用物质。例如,图1显示本发明的实施方案的整体流程图。该示例性纯化工艺由rhASA未经纯化的大块 (UPB) 的解冻和合并开始,然后将其捕获和通过超滤和渗滤 (“UFDF”) 过滤。在过滤之后,在色谱纯化之前经捕获的材料可以为病毒灭活(未显示)。在具体示出的实施方案中,下四个纯化工艺步骤利用连续四个色谱柱:阴离子交换柱(例如,Q Sepharose 快速流 (“Q-FF”) 柱)、陶瓷羟磷灰石I型 (HA) 柱、苯基柱和阳离子交换(例如,SP) 柱。在第四个和最后一个色谱步骤之后,将SP洗脱液浓缩和使用切向流超滤渗滤。然后将所得滤液病毒过滤(例如,通过 Planova® 20N病毒减少过滤器),之后为第二次浓缩和渗滤步骤以得到最终靶蛋白浓度。相比之下,图2示出本发明的另一示例性实施方案。工艺按照图1进行,任选使用一种或多种不同的色谱树脂(例如,TMAE阴离子交换树脂)。然而,在第四次即最后一个

色谱步骤之后,合并SP洗脱液,调节合并液的pH。在一些实施方案中,将pH调节到介于5.5和6.5之间(例如,约6.0)。然后将所得经调节pH的阳离子交换洗脱液病毒过滤,然后通过一次浓缩和渗滤步骤以得到最终靶蛋白浓度。这些工艺和另外的实施方案的任选精制在本文中描述。

[0121] 如本文所使用,“污染物”是不同于所需多肽产品(例如,芳基硫酸酯酶A(ASA))的材料。污染物可以为所需多肽的变体(例如,所需多肽的脱去酰氨基的变体或氨基-天冬氨酸变体)或者另外的分子,例如多肽、核酸和内毒素。

[0122] 如本文所使用,所谓由包含多肽和一种或多种污染物的组合物或样品中“纯化”多肽是指通过由组合物或样品中去除(完全或部分)至少一种污染物来增加在组合物或样品中多肽的纯度。“纯化步骤”可以为总个纯化工艺的一部分,从而得到包含至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%以重量计的所关注多肽的组合物,以组合物的总重量计。通过例如以下一种或多种方法可测定芳基硫酸酯酶A的纯度:宿主细胞蛋白(HCP)蛋白质印迹法、SDS-PAGE Coomassie染色、SDS-PAGE银染色、反相HPLC和尺寸排阻HPLC。在一些实施方案中,经纯化的芳基硫酸酯酶A的比活性为至少约50U/mg、60U/mg、70U/mg、80U/mg、90U/mg、100U/mg、110U/mg、120U/mg、130U/mg、140 U/mg,例如,如通过本文所述方法测定。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA具有范围为约50-200U/mg(例如,约50-190U/mg、50-180U/mg、50-170U/mg、50-160U/mg、50-150U/mg、50-140U/mg、50-130U/mg、50-120U/mg、50-110U/mg、50-100U/mg、60-140U/mg、60-130U/mg、60-120U/mg、60-110U/mg、60-100U/mg、70-140U/mg、70-130U/mg、70-120U/mg、70-110U/mg、70-100U/mg、80-140U/mg、80-130U/mg、80-120U/mg、80-110U/mg、80-100U/mg、90-140U/mg、90-130U/mg、90-120U/mg、90-110U/mg、90-100U/mg、100-140U/mg、100-130U/mg、100-120U/mg、100-110U/mg、110-140U/mg、110-130U/mg、110-120U/mg、120-140U/mg、120-130U/mg或130-140U/mg)的比活性,例如,如通过本文所述方法测定。

[0123] 纯化工艺的原材料为任何不纯制品。例如,不纯制品可以为未经处理的细胞培养基,该未经处理的细胞培养基含有由产生ASA蛋白的细胞(例如,哺乳动物细胞)分泌的重组ASA蛋白或者含有ASA蛋白的原始细胞裂解物。在一些实施方案中,不纯制品可以为部分经处理的细胞培养基或细胞裂解物。例如,细胞培养基或细胞裂解物可被浓缩、稀释、或者使用病毒灭活、病毒处理或病毒去除处理。在一些实施方案中,病毒去除可利用纳米过滤和/或色谱技术等。在一些实施方案中,病毒灭活可利用溶剂灭活、去污剂灭活、巴氏消毒法、酸性pH灭活、和/或紫外线灭活等。也可使用蛋白酶、DNA酶和/或RNA酶处理细胞培养基或细胞裂解物,从而减少宿主细蛋白和/或核酸(例如,DNA或RNA)的水平。在一些实施方案中,可将未经处理或部分经处理的生物材料(例如,细胞培养基或细胞裂解物)冷冻和保存在所需温度(例如,2-8℃、-4℃、-25℃、-75℃)下一段时间,然后解冻用于纯化。如本文所使用,不纯制品也称为原材料或装载材料。

[0124] 本文描述的纯化方法可包括但不限于以下步骤的一种或多种:深度过滤、病毒灭活、离子交换色谱(例如,离子交换色谱和/或阳离子交换色谱)、混合模式色谱、疏水相互作用色谱、超滤/渗滤和病毒去除过滤。在一些实施方案中,本文所述的纯化方法还包括亲和色谱。

[0125] 在色谱步骤中,当将树脂填充进入色谱柱时,所使用的树脂合适体积通过柱尺寸

(即,柱的直径和树脂的高度)反馈,并且取决于例如在应用的溶液中蛋白的量和所使用的树脂的结合容量来变化。然而,增加生产工艺以及纯化工艺的规模以获得工业规模上ASA的生产和纯化,这也是在本公开范围内。因此,可将参数(例如柱大小、直径和流速)增加以适应这种大规模生产的速度和效率。在一些实施方案中,柱直径的范围为约50-100mm;体积范围为约100-300ml;以及流速介于约40-400cm/小时之间(例如,介于约100cm/小时和150cm/小时之间)或约5至100ml。

[0126] 超滤-捕获

[0127] 在本发明的一些实施方案中,本文所公开的纯化方法包括上游超滤的一个或多个步骤以捕获由灌注生物反应器产生的ASA(例如,人重组ASA)。如本文所使用,超滤是指使用0.001至0.1 μ m大小过滤器孔径的膜过滤,它可用于浓缩和脱盐溶解的分子(蛋白、肽、核酸、碳水化合物和其他生物分子)、交换缓冲液和总分级分离部分(fractionation)。在本发明的实施方案中使用的超滤方法包括切向流超滤或横向流过滤。

[0128] 如本文所使用,切向流过滤和超滤是指进料流平行通过膜面处的安排,即当一部分进料流通过膜(渗透物)时,同时剩余部分(保留物)循环回进料储罐。在一些实施方案中,选择切向流超滤过滤器的孔径使得重组ASA可渗透通过过滤器。在其他实施方案中,选择孔径使得基本上所有ASA保留在通过过滤器的进料中。如其他处所述,在酸性条件(pH \leq 约5.0)下,ASA作为480kDa八聚体存在,而在中性pH水平下分解为二聚体。因此,可联合选择合适孔径来调节进料的pH,从而保留ASA在过滤器膜上或者使它作为渗透物通过。

[0129] 可选择具有至少10kDa、至少20kDa、至少30kDa、至少40kDa、至少50kDa、至少60kDa、至少70kDa、至少80kDa、至少90kDa、至少100kDa、至少300kDa、至少400kDa或至少500kDa的分子量截留的孔径。例如,具有至少10kDa孔径的过滤器将保留具有大约11kDa或更大分子量的大部分蛋白在进料中。如另一例子,至少400kDa孔径的过滤器将保留高于400kDa分子量的大部分蛋白。在一些实施方案中,进料保留率为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高。类似地,可选择具体尺寸渗透物分离的孔径。例如,具有至少500kDa孔径的过滤器将可使得大部分小于500kDa分子量的蛋白渗透通过。在一些实施方案中,渗透率为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高。

[0130] 也可优化过滤区域或容量来用于本文公开的工艺。影响过滤区域选择的考虑事项包括坚固性、费用、料流速(即,横向流速度)、跨膜压、渗透通量率、植物贴合性(plant fit)和处理量。在一些实施方案中,渗透通量为约50-100升/平方米/小时("LMH")。在一些实施方案中,进料流为括入式约250-600LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约250-350LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约175-245LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约170-230LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约120-160LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约15-30LMH。在一些实施方案中,进料流为括入式约11-21LMH。在一些实施方案中,过滤区域为约0.02m²、约0.14m²、约0.7或约3.5m²。在特定的实施方案中,跨膜压力为括入式约55-60psi。在一些实施方案中,跨膜压力为括入式约15-25psi。在一些实施方案中,跨膜压力为括入式约10-20psi。在一些实施方案中,跨膜压力为约5-15psi。

[0131] 在本发明的实施方案中使用的超滤过滤器可包括本领域技术人员已知的膜材料,包括但不限于聚醚砜和经稳定化的纤维素。在本发明的实施方案中使用的一种示例性过滤盒为Sartorius ECO®。在本发明的实施方案中使用的另一示例性过滤盒为Sartorius

HYDROSART® 30kD标准膜。

[0132] 深度过滤

[0133] 本文所述的纯化方法可包括深度过滤的一个或多个步骤。深度过滤器是使用多孔过滤介质使粒子通过介质而不是仅在介质表面的各种过滤器。它们包括具有分级密度的过滤介质,这使得较大粒子可在靠近过滤器表面处捕集,而较小粒子渗透过在过滤器表面处较大开放区域,仅在更靠近过滤器中心的较小开口处捕集。某些实施方案仅在上游回收阶段(即,在后续色谱纯化步骤之前)中采用深度过滤步骤,但其他实施方案在一个或多个另外的纯化阶段中采用深度过滤器。在本发明的一些实施方案中,使用Cuno Zeta Plus深度过滤器。

[0134] 深度过滤之后可任选为0.45微米($\pm 2\mu\text{m}$)过滤以在用于下游加工的制品中去除微粒和减少生物负载。

[0135] 病毒灭活

[0136] 本文所述的纯化方法可包括病毒灭活的一个或多个步骤。在一些实施方案中,病毒灭活包括溶剂和/或去污剂。溶剂或去污剂可包括例如聚山梨酯80、磷酸三丁酯(TnBP)或两者。病毒灭活可包括在溶剂或去污剂中3-24小时的孵育。在另一实施方案中,病毒灭活包括病毒过滤,例如通过使用Planova™过滤器。

[0137] 理解,预期这些方法导致酶的制备,该酶基本上没有传染性病毒,因而可标示为“病毒安全产品”。此外,预期各种方法可独立或联合使用。

[0138] 通过向包含酶的溶液中加入一种或多种“病毒灭活剂”可实现病毒灭活。在一些实施方案中,病毒灭活步骤在色谱纯化步之前进行(即,在装载不纯制品到第一色谱柱之前),从而确保当用作药物时或产品用于制备药物时,该试剂不以任何量或浓度存在于最终产品中;其他实施方案在一个或多个另外的纯化阶段中采用深度过滤器。例如,在一些实施方案中,根据本发明的发明方法还包括在最后色谱柱之后的病毒去除步骤。

[0139] 术语“病毒灭活剂”预期表示可用于灭活脂质包封的病毒以及非脂质包封的病毒的试剂(例如,去污剂)或方法。术语“病毒灭活剂”理解为包括只要合适时的这些试剂和/或方法的组合,以及这些试剂或方法的仅一种类型。

[0140] 典型病毒灭活剂为去污剂和/或溶剂、大部分常见去污剂溶剂混合物。理解,病毒灭活剂任选为一种或多种去污剂与一种或多种溶剂的混合物。广泛的去污剂和溶剂可用于病毒灭活。去污剂可选自非离子和离子去污剂组成的组,并且选自基本上非变性的去污剂。通常,使用非离子去污剂,这是由于它便于随后在后续纯化步骤中由rASA制品中去除去污剂。合适的去污剂例如通过Shanbrom等人,在美国专利4,314,997和美国专利4,315,919中描述。典型去污剂为在商标Triton X-100和吐温20或吐温80市售的那些去污剂。在病毒-灭活剂中使用的优选溶剂为如通过例如Neurath和Horowitz在美国专利4,764,369中描述的二或三烷基磷酸酯。典型溶剂为磷酸三丁酯(TnBP)。本发明的实施中特别优选的病毒-灭活剂为吐温80,但是作为另外一种选择,也可使用其他试剂或者试剂组合。以使得在含ASA的溶液中吐温80的浓度在约0.5-4.0%以重量计范围(优选约1%以重量计的浓度)加入典型试剂。然后可将TnBP加入0.3%的以含ASA的样品新体积计算的最终浓度。

[0141] 在灭活包封的病毒的条件下进行病毒-灭活步骤,得到含基本上病毒安全rhASA的溶液。通常,这些条件包括4-37°C的温度(例如19-28°C、23-27°C、通常约25°C)和通过验证

研究证实有效的孵育时间。一般来说,1-24小时的孵育时间足够,优选10-18小时,例如约14小时,从而确保充分病毒灭活。然而,合适条件(温度和孵育时间)取决于所采用的病毒灭活剂、溶液的pH和蛋白浓度以及脂质含量。

[0142] 预期,也可采用去除或灭活病毒的其他方法以产生病毒安全产品,例如,加入亚甲蓝、随后使用紫外光通过辐射来灭活。

[0143] 本文所述的纯化方法可包括病毒去除过滤的一个或多个步骤。通常,在通过色谱的一个或多个步骤对酶纯化之后进行病毒过滤。在一些实施方案中,病毒过滤步骤通过传递含ASA溶液(其为纯化步骤的结果)通过无菌过滤器和随后传递无菌过滤的溶液通过纳米过滤器来进行。所谓“无菌过滤器”是指基本上去除能够繁殖和/或导致感染的所有微生物的过滤器。而通常过滤器具有约0.1微米的孔径,孔径的范围可以介于约0.05和0.3微米之间。当进行纯化工艺时,将样品的病毒过滤替换为使样品与去污剂接触或者使样品的病毒过滤与使样品与去污剂接触合并是可行的。

[0144] 本发明的一些实施方案包括病毒灭活和/或过滤至少两步。例如,在柱色谱之前的病毒灭活可以与在所有色谱步骤均完成之后的病毒去除合并。可在超滤/渗滤(UFDF)的一个或多个步骤(例如,切向流超滤)之前或之后进行色谱柱后病毒去除。在具体的例子中,洗脱液由色谱纯化的最后步骤(例如,阳离子交换(SP)色谱)中获得,并且将合并洗脱液的pH调节到约5.5、约6.0、约6.5或约7.0,之后为病毒过滤。因此,在某些实施方案中,UFDF的单一步骤在病毒过滤(例如,使用Planova™过滤器)之前。在其他例子中,洗脱液由色谱纯化的最后步骤(例如,阳离子交换(SP)色谱)中获得,使该洗脱液没有调节pH下进行UFDF的第一步,然后进行病毒过滤和UFDF的第二步。

[0145] 在某些实施方案中,经调节pH的阳离子交换合并洗脱液在Planova 20N过滤器上病毒过滤。在一些实施方案中,在经调节pH的阳离子交换洗脱液的病毒过滤之后,如通过A280吸光度测定的相对输入的产率介于约90-100%之间,即,约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更大。因此,在一些实施方案中,在病毒过滤中基本上没有损耗重组ASA。病毒过滤产率很重要,因为它证实pH调节到约6.0使得ASA的八聚合体(它的直径为约20nm)可分解为二聚型。因此,可选择病毒过滤器的孔径来确保仅过滤二聚型(即,八聚合型可通过过滤器保留或者导致病毒过滤器堵塞)。例如,具有20nm孔径的病毒过滤器将保留ASA的八聚合型,而不是二聚型。

[0146] 亲和色谱

[0147] 本文所述的纯化方法可包括亲和色谱的一个或多个步骤(例如,免疫亲和色谱、固定化金属离子亲和色谱和/或固定化配体亲和色谱)。

[0148] 简而言之,亲和色谱是取决于高相互作用(例如介于受体和配体、抗原和抗体或者酶和底物之间)的色谱技术。如本领域技术人员所已知,在本文所述的纯化方法的亲和色谱步骤中采用的选择性分子可以基于通过选择性分子可利用的重组产生的ASA的各种特性(例如,三维结构、糖基化等)。在亲和力色谱步骤中可利用的示例性选择性分子(或捕获剂)包括蛋白A、蛋白G、抗体、金属离子(例如,镍)、具体底物、配体或抗原。在一些实施方案中,用于本发明的亲和力色谱步骤的合适选择性分子利用抗芳基硫酸酯酶A抗体(例如,抗人芳基硫酸酯酶A抗体)。合适的抗芳基硫酸酯酶A抗体可市售或者通过非人动物(例如,小鼠、大鼠、兔子、鸡、山羊、绵羊、马或其用于产生针对人蛋白抗体的其他合适动物)的固定化获得。

[0149] 一般来说,所关注的分子(例如,重组ASA)在固体或固定相或者介质上通过与选择性分子的相互作用被捕集,而其他非所需分子没有被捕集,因为它们没有被选择性分子结合。然后可将固体介质由混合物中去除,任选洗涤,然后使所关注分子通过洗脱由捕集物中释放。在一些实施方案中,通过梯度改变离子强度可洗脱亲和柱。例如,盐浓度、pH、pI和离子强度可用于分离或形成分离梯度。

[0150] 在一些实施方案中,可产生具有标签的重组ASA蛋白以便于纯化亲和色谱。如本领域技术人员所已知,蛋白标签可包括例如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、六聚组氨酸(His)、麦芽糖结合蛋白(MBP)等。在一些实施方案中,在亲和色谱中使用凝集素以分离在样品内的组分。例如,某些凝集素特异性结合特定糖分子,并且可用于由非糖基化蛋白中分离糖蛋白,或者由一种糖型中分离另一种糖型。

[0151] 离子交换色谱

[0152] 本文所述的纯化方法可包括离子交换色谱(例如,离子交换色谱和/或阳离子交换色谱)的一个或多个步骤。

[0153] 如本领域技术人员所已知,离子交换剂(例如,阴离子交换剂和/或阳离子交换剂)可以基于与基质以及附接带电基团相关的各种材料。例如,可使用以下基质,其中所提及材料或多或少可交联:琼脂糖基(例如SEPHAROSE™ CL-6B、SEPHAROSE™快速流和SEPHAROSE™高性能)、纤维素基(例如DEAESEPHACEL®)、葡聚糖基(例如SEPHADEX®)、二氧化硅基和合成聚合物基。

[0154] 根据已知方法可制备离子交换树脂。通常,在将包含多肽和一种或多种污染物的样品或组合物装载到树脂上之前,使得树脂与它的平衡离子结合的平衡缓冲液可流过离子交换树脂。合宜地,平衡缓冲液可同样为装载缓冲液,但是这并不是必需的。

[0155] 在本发明的任选实施方案中,在多肽洗脱之后,可使用再生缓冲液再生离子交换树脂,使得柱可再利用。一般来说,再生缓冲液的盐浓度和/或pH可使得基本上所有污染物和所关注多肽均由离子交换树脂中洗脱。一般来说,再生缓冲液具有用于洗脱离子交换树脂中污染物和多肽的非常高的盐浓度。

[0156] 阴离子交换色谱

[0157] 本发明的实施方案包括例如提供芳基硫酸酯酶A(例如,重组芳基硫酸酯酶A)的样品以及使样品进行阴离子交换色谱(例如,本文所述的阴离子交换色谱)。对于阴离子交换树脂,与基质共价连接的带电基团可以为例如二乙氨基乙基(DEAE)、季铵基乙基(QAE)和/或季铵(Q)。在一些实施方案中,所采用的阴离子交换树脂为Q Sepharose柱。使用例如Q SEPHAROSE™快速流柱、Q SEPHAROSE™高性能柱、Q SEPHAROSE™ XL、CAPTO™ Q、DEAE、TOY OPEARL GIGACAP®Q、FRACTOGEL® TMAE(三甲基氨基乙基,季铵树脂)、ESHMUNO™ Q、NUVIA™ Q或UNOSPHERE™ Q可进行阴离子交换色谱。在本发明的范围内可使用其他阴离子交换剂,这些阴离子交换剂包括但不限于:季铵树脂或“Q-树脂”(例如,C APTOTM-Q、Q-SEPHAROSE®、QAE SEPHADEX®);二乙氨基乙烷(DEAE)树脂(例如,DEAE-TRISACRYL®、DEAE SEPHAROSE®、苯甲酰化萘酚化DEAE、二乙氨基乙基SEPHACEL®);AMBERJET®树脂;AMBERLYST®树脂;AMBERLITE®树脂(例如,AMBERLITE® IRA-67、AMBERLITE®强碱性、AMBERLITE®弱碱性);消胆胺树脂;ProPac®树脂(例如,PROPAC® SAX-10、PROPAC® WAX-10、PROPAC® WCX-10);TSK-GEL®树脂(例如,TSKgel D EAE-NPR、TSKgel DEAE-5PW);和ACCLAIM®树脂。在一些实

施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阴离子交换色谱为在约23℃或更低、约18℃或更低或者约16℃或更低的温度下(例如,约23℃、约20℃、约18℃或约16℃)进行。

[0158] 用于阴离子交换色谱的典型流动相包括相对极性溶液,例如水、乙腈、有机醇(例如甲醇、乙醇和异丙醇)或者含有2-(N-吗啉代)-乙磺酸(MES)的溶液。因此,在某些实施方案中,流动相包括约0%、1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%极性溶液。在某些实施方案中,流动相包括在分离过程中在任何给定时间下介于约1%至约100%、约5%至约95%、约10%至约90%、约20%至约80%、约30%至约70%或约40%至约60%极性溶液。

[0159] 在某些实施方案中,将rASA装载在约23AU/L树脂或更小的结合容量下,例如,约19AU/L树脂或更小、约15AU/L树脂或更小、或约12AU/L树脂或更小;例如,介于约12AU/L树脂和约15AU/L树脂之间或者介于约15AU/L树脂和约19AU/L树脂之间。在一些实施方案中,将芳基硫酸酯酶A的样品以至少约4.5g/L树脂(例如,至少约5g/L树脂、6g/L树脂、7g/L树脂、8g/L树脂、9g/L树脂、10g/L树脂、11g/L树脂、12g/L树脂、13g/L树脂、14g/L树脂或15g/L树脂)的结合容量装载到阴离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,将芳基硫酸酯酶A的样品以范围介于约4.5-20g/L树脂之间(例如,范围介于约5-20g/L树脂、5-19g/L树脂、5-18g/L树脂、5-17g/L树脂、5-16g/L树脂、5-15g/L树脂、7.5-20g/L树脂、7.5-19g/L树脂、7.5-18g/L树脂、7.5-17g/L树脂、7.5-16g/L树脂、7.5-15g/L树脂、10-20g/L树脂、10-19g/L树脂、10-18g/L树脂、10-17g/L树脂、10-16g/L树脂或10-15g/L树脂之间)的结合容量装载到阴离子交换色谱柱上。

[0160] 使用装载缓冲液可将包含ASA和污染物的水溶液作为流动相装载到阴离子树脂上,该装载缓冲液具有使得多肽和污染物结合阴离子交换树脂的盐浓度和/或pH。然后使用一个或多个柱体积的装载缓冲液可洗涤树脂,然后为其中盐浓度增加的一个或多个柱体积的洗涤缓冲液。最后,通过盐浓度增加的洗脱缓冲液可洗脱ASA。任选地,通过逐渐或逐步降低pH也可介导酶的洗脱。可收集含有ASA活性的部分,并合并用于进一步纯化。

[0161] 在一些实施方案中,使用装载缓冲液进行将芳基硫酸酯酶A样品装载到阴离子交换色谱柱上。在一个实施方案中,装载缓冲液不含有氯化钠。在另一实施方案中,装载缓冲液含有氯化钠。例如,装载缓冲液的氯化钠浓度为约1mM至约25mM,例如,约1mM至约10mM、约1mM至约5mM或者约5mM至约10mM。在一些实施方案中,在流动相中盐浓度呈梯度(例如,线性或非线性梯度)。在一些实施方案中,在流动相中盐浓度恒定。在一些实施方案中,在流动相中盐浓度可逐步增加或降低。在一些实施方案中,在约5至约9的pH(例如约6至约8,例如约7)下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阴离子交换色谱柱上。

[0162] 在一些实施方案中,使用一种或多种洗涤缓冲液来进行阴离子交换色谱柱的洗涤。例如,洗涤阴离子交换柱可包括两个或多个(例如,第一和第二)洗涤步骤,每一步骤均使用不同的洗涤缓冲液。在一个实施方案中,洗涤缓冲液不含有氯化钠。在另一实施方案中,洗涤缓冲液含有氯化钠。例如,洗涤缓冲液的氯化钠浓度为约50mM至约200mM,例如约50mM至约150mM、约100mM至约200mM或者约100mM至约150mM;例如约80mM、约100mM、约120mM或约140mM。在一些实施方案中,在约5至约9(例如约6至约8,例如约7)的pH下进行阴离子交换色谱柱的洗涤。

[0163] 在一个实施方案中,洗脱缓冲液含有磷酸钠。例如,洗脱缓冲液的磷酸钠浓度为约20mM至约50mM,例如,约25mM至约45mM;例如,约30mM、约35mM或约40mM。在另一实施方案中,洗脱缓冲液不含有氯化钠。在又一实施方案中,洗脱缓冲液含有氯化钠。例如,洗脱缓冲液的氯化钠浓度为约200mM至约300mM,例如,约240mM至约280mM。在一些实施方案中,在约5至约9的pH下(例如,约6至约8,例如,约7)进行由阴离子交换色谱柱洗脱芳基硫酸酯酶A。

[0164] 在一些实施方案中,由阴离子交换色谱柱洗脱芳基硫酸酯酶A包括洗脱峰值采集的一个或多个步骤。例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),例如,洗脱峰值采集由上升侧处约50mAU开始到下降侧处约50mAU,例如,上升侧处约100mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约200mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约100mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约200mAU或者上升侧处约100mAU到下降侧处约100mAU。

[0165] 对于本领域普通技术人员显而易见,多种不同缓冲液可用于装载、洗涤和洗脱步骤。然而,通常,使用包含0.05M MES-Tris,pH 7.0的缓冲液的1-10柱洗涤液可平衡柱。为了方便,可将样品装载在纯化工艺之前步骤的缓冲液中,或者使用装载缓冲液可装载样品。使用1-10柱体积的用于平衡的缓冲液可洗涤柱,然后为包含0.02MES-Tris,0.12M NaCl,pH 7.0的洗涤缓冲液。作为另外一种选择,使用用于阴离子交换色谱的本文所述的任何其他平衡、装载和洗涤缓冲液可平衡、装载和洗涤柱。在包含0.02MES-Tris,0.26M NaCl,pH 7.0的缓冲液中可洗脱样品。作为另外一种选择,在用于阴离子交换色谱的本文所述的任何其他洗脱缓冲液中可洗脱样品。

[0166] 本文所述的装载缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液可包括一种或多种缓冲液。例如,缓冲液可以为TRIS、HEPES、MOPS、PIPES、SSC、MES、磷酸钠、醋酸钠或其组合。缓冲液的浓度介于约1mM至约500mM之间,例如,介于约10mM至约250mM之间;介于约20mM至约100mM之间,介于约1mM至5mM之间;介于约5mM至10mM之间;介于约10mM至50mM之间;或者介于约50mM至约100mM之间;例如,约1mM、约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM。

[0167] 阴离子交换色谱之后的产率、活性和纯度可改变。在一些实施方案中,芳基硫酸酯酶A活性产率为至少约75%,例如,至少约85%,例如,介于约85%至约99%之间、或者介于约90%至约99%之间。在一些实施方案中,例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),蛋白产率(AU或吸光度单位)为约10%至50%,例如约20%至约35%或者约25%至约30%。在一些实施方案(例如,如下所述使用TMAE柱的那些)中,例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),洗脱合并蛋白活性产率((AU或吸光度单位)为约70%至400%,例如,约80%至约390%、或约90%至约350%、或约100%至150%、大于至少95%。在一些实施方案(例如,如下所述使用TMAE柱的那些)中,宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)介于约0.5至约1.1之间,例如介于约0.6至0.9之间、或者介于约0.7至0.8之间。在一些实施方案(例如,如下所述使用TMAE柱的那些)中,如通过例如毛细管电泳-SDS PAGE所测定,纯度为至少75%,例如,至少80%、至少85%、至少90%或更高。在优选的实施方案中,阴离子交换色谱之后的活性产率、HCP LRV和纯度(如通过毛细管电泳-SDS PAGE所测定)分别为至少约90%、至少约0.6和至少约80%。

[0168] 在本发明的优选实施方案中,使用具有高装载容量的阴离子交换柱。在本发明的某些实施方案中,柱的特征在于范围介于约3-20g/L(即,约5-15g/L、约10-15g/L、约10-20g/L)之间的装载。在一些实施方案中,装载容量显著大于4.3g/L(例如,为或大于约10g/L)

L、12.5g/L、15g/L、17.5g/L或20g/L)。在某些实施方案中,树脂的结合容量介于约75-100AU/L之间(例如约75AU/L、约80AU/L、约85AU/L、约90AU/L、约95AU/L)。在某些实施方案中,装载容量大于约80AU/L。在一些实施方案中,高装载容量柱为TMAE柱。在特定的实施方案中,柱选自由以下组成的组:Fractogel® TMAE柱、Nuvia Q柱、Q Sepharose快速流柱、Capto Q柱、Q Sepharose XL柱、Eshmuno Q柱、UNOsphere Q柱或者GigaCap Q柱。

[0169] 在本发明的特定实施方案中,在7.0的pH下使用包含约20mM MES-Tris和1000mM NaCl的缓冲液预平衡TMAE柱。在某些实施方案中,在7.0的pH下使用包含50mM MES-Tris的缓冲液来平衡柱。在一些实施方案中,TMAE柱的装载流速为约75-125cm/h(即,约75-115cm/h、约75-110cm/h、约75-105cm/h、约75-100cm/h、约85-115cm/h、约85-110cm/h、约85-105cm/h、约85-100cm/h、约95-115cm/h、约95-110cm/h、约95-105cm/h、约95-100cm/h、约100-120cm/h、约100-115cm/h、约100-110cm/h、约100cm/h)。可优化装载条件和通过如本文所述的A280吸光度来评估。

[0170] 在利用TMAE柱(例如,Fractogel TMAE柱)的特定实施方案中,在装载中非常少的产品在流过中损耗,即使在大于15g/L的装载容量下。在纯化方法中增加装载容量能力同时减少流过损耗是显著的改善。在本发明的特定实施方案中,流过产品损耗的量小于30%装载(例如小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%或小于约5%)。

[0171] 在一些实施方案中,在装载之后,将TMAE柱至少洗涤一次。在特定的实施方案中,将柱洗涤两次。第一和第二洗涤缓冲液可包含优化水平的氯化钠。在一些实施方案中,作为第一或第二洗涤缓冲液的氯化钠的量为介于约50-150mM之间(例如约50-140mM、约50-130mM、约50-120mM、约50-110mM、约50-100mM、约50-90mM、约50-80mM、约80-150mM、约80-140mM、约80-130mM、约80-120mM、约80-110mM、约80-100mM、约80-90mM、约80mM或约120mM)。在一些实施方案中,在pH 7.0下第一洗涤缓冲液包含50mM MES-Tris。在一些实施方案中,在pH 7.0下第二洗涤缓冲液包含20mM MES-Tris,100mM NaCl。洗涤条件的进一步优化、特别是第二洗涤条件涵盖在本发明的实施方案内。例如,增加第二次洗涤的盐浓度可改善宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)和总纯度,但降低活性和A280产率。如本文所述,必须使用以下所述的洗脱条件来平衡特定洗涤条件,从而提供纯度、活性和产率的优化组合。

[0172] 在本发明的实施方案中,使用洗脱缓冲液来洗脱与TMAE柱结合的重组ASA。在一些实施方案中,优化在洗脱缓冲液中氯化钠的量。在特定的实施方案中,在洗脱缓冲液中氯化钠的量介于约150-300mM之间(例如约150-290mM、约150-280mM、约150-270mM、约150-260mM、约150-250mM、约150-240mM、约150-230mM、约150-220mM、约150-210mM、约170-290mM、约170-280mM、约170-270mM、约170-260mM、约170-250mM、约170-240mM、约170-230mM、约170-220mM、约170-210mM约180-290mM、约180-280mM、约180-270mM、约180-260mM、约180-250mM、约180-240mM、约180-230mM、约180-220mM、约180-210mM、约180、约220或约260)。在特定的例子中,在7.0的pH下洗脱缓冲液包含50mM MES-Tris和1M NaCl。在一些实施方案中,在洗脱之后A280产率为大于60%的装载(例如,约60%、约70%、约80%或更高)。洗脱条件的进一步优化涵盖在本发明的实施方案内。例如,增加洗脱盐浓度(即,传导性)提供更好的产率,但是得到较差的纯度和HCP去除。并且如上所示,必须使用洗脱条件来平衡特定洗涤条件,从而提供纯度、活性和产率的优化组合。

[0173] 阳离子交换色谱

[0174] 在一些实施方案中,本方法还包括使芳基硫酸酯酶A的用品进行阳离子交换色谱,例如,如本文所述的磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱。在一些实施方案中,在阳离子交换色谱之前,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阴离子交换色谱。在典型实施方案中,阳离子交换色谱包括磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱,但是可使用其他阳离子色谱膜或树脂,MUSTANG™ S膜、S-SEPHAROSE™树脂或者蓝色SEPHAROSE™树脂。在一些实施方案中,本方法还包括例如通过超滤和/或渗滤(例如,通过切向流超滤)浓缩和/或过滤芳基硫酸酯酶A的样品。在例如如本文所述的优化温度下可进行阳离子交换色谱,从而增加靶结合和/或降低杂质结合。例如,在约23℃、18℃、16℃或更低的温度下可进行阳离子交换色谱。

[0175] 在一个实施方案中,阳离子交换色谱包括磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱。在另一实施方案中,阳离子交换色谱为研磨步骤。使用例如以下的一种或多种可进行阳离子交换色谱(例如,磺丙基 (SP) 阳离子交换色谱): TOYOPEARL® SP-650、TOYOPEARL® SP-550、TSKGEL® SP-3PW、TSKGEL® SP-5PW、SP SEPHAROSE™快速流柱、SP SEPHAROSE™高性能柱、SP SEPHAROSE™ XL、SARTOBIND® S膜、POROS® HS50、UNOSPHERE™ S和MACROCAP™ S。

[0176] 使用装载缓冲液可将包含芳基硫酸酯酶A和污染物的水溶液装载到阳离子树脂上,该装载缓冲液具有使得多肽和污染物结合阳离子交换树脂的盐浓度和/或pH。然后使用一个或多个柱体积的平衡缓冲液或装载缓冲液可洗涤树脂,然后任选为其中盐浓度增加的一个或多个柱体积的洗涤缓冲液。最后,在洗脱缓冲液中可洗脱芳基硫酸酯酶A。可收集含有芳基硫酸酯酶A活性的部分,并合并用于进一步纯化。

[0177] 在典型实施方案中,在例如如本文所述可优化装载缓冲液、洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的NaCl浓度和/或pH,从而增加靶结合和/或降低杂质结合。在一些实施方案中,在装载缓冲液中NaCl浓度为约20mM、15mM、10mM或更低。在一些实施方案中,装载缓冲液具有约4.5、4.3、4.0或更低的pH。在一些实施方案中,在洗涤缓冲液中NaCl浓度为约20mM、15mM、10mM或更低。在一些实施方案中,在洗脱缓冲液中NaCl浓度为约55mM、50mM、45mM、40mM或更低。

[0178] 在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱包括:将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子色谱柱(例如,磺丙基 (SP) 阳离子交换柱)上;洗涤阳离子交换色谱柱;和由柱中洗脱芳基硫酸酯酶A。在一些实施方案中,使用超过3(例如,5至10)柱体积的0.01M NaAc,0.01M NaCl,0.03M乙酸,pH 4.2可平衡柱。

[0179] 在一些实施方案中,可将样品装载在纯化工艺之前步骤的缓冲液中,或者使用装载缓冲液可装载样品。在一个实施方案中,装载缓冲液含有氯化钠。例如,装载缓冲液的氯化钠浓度为约1mM至约25mM,例如,约5mM至约20mM,例如,约5mM、约10mM、约15mM或约20mM。在另一实施方案中,装载缓冲液含有醋酸钠。例如,装载缓冲液的醋酸钠浓度为约10mM至约100mM,例如,约20mM、约40mM或约60mM。在一些实施方案中,在约3.0至约6.0的pH(例如约4.0至约5.0,例如,约4.0、约4.3或约4.5)下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,在约15AU/L树脂或更小的结合容量下(例如,约14AU/L树脂或更小或约12AU/L树脂或更小;例如,介于约10AU/L树脂至约14AU/L树脂之间或者介于约10AU/L树脂至约12AU/L树脂之间)将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。

[0180] 在一些实施方案中,使用一种或多种洗涤缓冲液进行阳离子交换色谱柱的洗涤。例如,洗涤阳离子交换柱可包括两个或多个(例如,第一和第二)洗涤步骤,每一步骤均使用

不同的洗涤缓冲液。可使用1-10柱体积的用于平衡的缓冲液来洗涤柱。作为另外一种选择,使用用于阳离子交换色谱的本文所述的任何其他平衡、装载和洗涤缓冲液可平衡、装载和洗涤柱。在一个实施方案中,洗涤缓冲液含有氯化钠。例如,洗涤缓冲液的氯化钠浓度为约1mM至约25mM,例如,约5mM至约20mM或者约10mM至约15mM;例如,约5mM、约10mM、约15mM或约20mM。在另一实施方案中,洗涤缓冲液含有醋酸钠。例如,装载缓冲液的醋酸钠浓度为约10mM至约100mM,例如,约20mM、约40mM或约60mM。在一些实施方案中,在约3.0至约6.0(例如,约4.0至约5.0,例如,约4.0、约4.3或约4.5)的pH下进行阳离子交换色谱柱的洗涤。

[0181] 在一些实施方案中,使用洗脱缓冲液进行由阳离子交换色谱柱中洗脱芳基硫酸酯酶A。在一个实施方案中,洗脱缓冲液包含氯化钠。例如,洗脱缓冲液的氯化钠浓度为约25mM至约75mM,例如,约45mM至约60mM;例如,约45mM、约50mM、约55mM或约55mM。在一些实施方案中,在约3.0至约6.0(例如,约4.0至约5.0;例如,约4.0、约4.3或约4.5)的pH下进行由阳离子交换色谱柱洗脱芳基硫酸酯酶A。因此,如一个特定例子,在包含0.02M NaAc, 0.05M NaCl, pH 4.5的缓冲液中洗脱样品。作为另外一种选择,在用于阳离子交换色谱的本文所述的任何其他洗脱缓冲液中可洗脱样品。

[0182] 在一些实施方案中,由阳离子交换色谱柱中洗脱芳基硫酸酯酶A包括洗脱峰值采集的一个或多个步骤。例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),例如,洗脱峰值采集由上升侧处约50mAU开始到下降侧处约50mAU,例如,上升侧处约100mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约200mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约100mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约200mAU或者上升侧处约100mAU到下降侧处约100mAU。可合并采集的洗脱液峰值。

[0183] 本文所述的装载缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液可包括一种或多种缓冲液。例如,缓冲液可以为TRIS、HEPES、MOPS、PIPES、SSC、MES,磷酸钠、醋酸钠或其组合。缓冲液的浓度介于约1mM至约500mM之间,例如,介于约10mM至约250mM之间;介于约20mM至约100mM之间,介于约1mM至5mM之间;介于约5mM至10mM之间;介于约10mM至50mM之间;或者介于约50mM至约100mM之间;例如,约1mM、约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM。

[0184] 在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在约23℃或更低、约18℃或更低或者约16℃或更低的温度下(例如,约23℃、约20℃、约18℃或约16℃)进行。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在介于约23℃至约16℃之间下(例如,约23℃、约20℃、约18℃或约16℃)进行,并且在介于约4.5至约4.3之间(例如,约4.5、约4.4或约4.3)的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在约23℃下进行,并且在约4.5的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在约23℃下进行,并且在约4.3的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在约18℃下进行,并且在约4.5的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行阳离子交换色谱为在约18℃下进行,并且在约4.3的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到阳离子交换色谱柱上。

[0185] 阳离子交换色谱之后的产率可改变。在一些实施方案中,芳基硫酸酯酶A活性产率

为至少约75%，例如，至少约80%，例如，介于约80%至约105%之间。在一些实施方案中，例如，如通过分光光度法测定（例如，在280nm下），蛋白产率（AU或吸光度单位）为约65%至100%，例如，约70%至约95%。

[0186] 阳离子交换色谱之后的纯度和活性得到较大改善。在一些实施方案中，宿主细胞蛋白（HCP）对数减少值（LRV）介于约1.0至约2.5之间，例如介于约1.5至约2.0之间或者介于约1.7至约1.9之间。例如，如通过本文所述方法测定，经纯化的芳基硫酸酯酶A的比活性可以为至少约50U/mg至约140U/mg，例如，至少约70U/mg、至少约90U/mg、至少约100U/mg或至少约120U/mg。在一些实施方案中，将芳基硫酸酯酶A纯化为至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%或至少约99.9%。通过例如以下一种或多种方法可测定芳基硫酸酯酶A的纯度：宿主细胞蛋白（HCP）蛋白质印迹法、SDS-PAGE Coomassie染色、SDS-PAGE银染色、反相HPLC和尺寸排阻HPLC。在某些实施方案中，降低装载缓冲液的盐浓度和降低它的pH增加ASA与阳离子交换柱的结合，但是不会影响杂质结合。换言之，在阳离子交换色谱之后如上所示的盐浓度和pH的优化平衡可增加产率，而不会不利地影响纯度。

[0187] 在一些实施方案中，可调节阳离子交换合并洗脱液的pH。在某些实施方案中，在病毒过滤之前立即调节pH。使用包含0.25M磷酸钠，1.33M氯化钠，0.34M柠檬酸钠，pH 7.0的pH调节缓冲液可将阳离子交换洗脱液（例如，SP洗脱液）pH调节到约5.5、约6.0、约6.5或约7.0。在某些实施方案中，在Planova 20N过滤器上病毒过滤经调节pH的SP合并洗脱液。在一些实施方案中，在经调节pH的阳离子交换洗脱液的病毒过滤之后，如通过A280吸光度测定的相对输入的产率介于约90-100%之间，即，约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更大。病毒过滤产率很重要，因为它证实pH调节到约6.0使得ASA的八聚合体（它的直径为约20nm）可分解为二聚型。因此，可选择病毒过滤器的孔径来确保仅过滤二聚型（即，八聚合型可通过过滤器保留或者导致病毒过滤器堵塞）。例如，具有20nm孔径的病毒过滤器将保留ASA的八聚合型，而不是二聚型。

[0188] 混合模式色谱

[0189] 本文所述的纯化方法可包括混合模式色谱的一个或多个步骤。混合模式色谱是其中应用多种分离方式以解析不同分子混合物的色谱类型，典型为液相色谱。例如，混合式分离可包括同时具有离子交换和反相特性的组合相。具有多于一种相互作用类型的这些固定相可由多种柱生产商获得。

[0190] 一方面，本公开的特征为由样品中纯化芳基硫酸酯酶A的方法，其中该方法包括例如提供芳基硫酸酯酶A（例如，重组芳基硫酸酯酶A）的样品和使芳基硫酸酯酶A的样品进行混合模式色谱，例如，本文所述的混合模式色谱，例如包括陶瓷羟磷灰石（HA）色谱（例如，羟磷灰石I型或II型色谱）的方法。在一些实施方案中，使用以下一种或多种来进行混合模式色谱：CHT™陶瓷羟磷灰石I型介质、CHT™陶瓷羟磷灰石II型介质、BIO-GEL®HT羟磷灰石和BIO-GEL®HTP羟磷灰石。

[0191] 在一些实施方案中，使芳基硫酸酯酶A的样品进行混合模式色谱包括：将芳基硫酸酯酶A的样品装载到混合模式色谱柱（例如，HA色谱）上；洗涤混合模式色谱柱；和由柱中洗脱芳基硫酸酯酶A。在一些实施方案中，使芳基硫酸酯酶A的样品进行混合式交换色谱为在约23℃或更低、约18℃或更低或者约16℃或更低的温度下（例如，约23℃、约20℃、约18℃或

约16℃)进行。

[0192] 在一些实施方案中,使用装载缓冲液进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到混合模式色谱柱上。在一个实施方案中,装载缓冲液含有磷酸钠。例如,装载缓冲液的磷酸钠浓度为约1mM至约10mM,例如,约1mM至约5mM、约5mM至约10mM;例如,约1mM、约2mM或约5mM。在另一实施方案中,装载缓冲液含有氯化钠。例如,装载缓冲液的氯化钠浓度为约100mM至约400mM,例如,约200至约300mM,例如,约220mM、约240mM、约260mM或约280mM。

[0193] 在一些实施方案中,在约5至约9(例如,约6至约8,例如,约7)的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到混合模式色谱柱上。

[0194] 在一些实施方案中,混合模式色谱包括陶瓷羟磷灰石(HA)色谱。羟磷灰石(HAP)通常是指磷酸钙的晶形。HAP的作用机制包括在树脂上带负电的蛋白羧基基团和带正电荷的钙离子之间以及在树脂上带正电荷的蛋白氨基基团和带负电的磷酸根离子之间的非特异性相互作用。通过调节缓冲液的pH可将碱性或酸性蛋白选择性吸收到柱上;通过改变缓冲液的盐浓度可完成洗脱。再者,显然,可采用多种缓冲液组合物以及缓冲液的组合。然而,通常,使用包含0.001M NaPO_4 , 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0的缓冲液的1-10柱洗涤液可平衡柱。为了方便,可将样品装载在纯化工艺之前步骤的缓冲液中,或者使用装载缓冲液可装载样品。使用1-10柱体积的用于平衡的缓冲液可洗涤柱,然后为包含0.005M NaPO_4 , 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0的洗涤缓冲液。作为另外一种选择,使用用于混合模式色谱的本文所述的任何其他平衡、装载和洗涤缓冲液可平衡、装载和洗涤柱。在包含0.04M NaPO_4 , pH 7.0的缓冲液中可洗脱样品。任选地,通过使用1-10柱体积的0.4M NaPO_4 , pH 12可洗提柱。作为另外一种选择,在用于混合模式色谱的本文所述的任何其他洗脱缓冲液中可洗脱样品。

[0195] 在一些实施方案中,使用一种或多种洗涤缓冲液来进行混合模式色谱柱的洗涤。例如,洗涤混合模式色谱柱可包括两个或多个(例如,第一和第二)洗涤步骤,每一步骤均使用不同的洗涤缓冲液。

[0196] 在一个实施方案中,洗涤缓冲液含有磷酸钠。例如,洗涤缓冲液的磷酸钠浓度为约1mM至约10mM,例如,约1mM至约5mM、约5mM至约10mM;例如,约1mM、约5mM或约10mM。在另一实施方案中,洗涤缓冲液含有氯化钠。例如,洗涤缓冲液的氯化钠浓度为约50mM至约600mM,例如,约100mM至约500mM、或者约200至约400mM;例如,约220mM、约240mM、约260mM或约280mM。

[0197] 在一些实施方案中,在约5至约9(例如,约6至约8,例如,约7)的pH下进行混合模式色谱柱的洗涤。

[0198] 在一些实施方案中,在约5至约9(例如,约6至约8,例如,约7)的pH下进行由混合模式色谱柱洗脱芳基硫酸酯酶A。在一些实施方案中,由混合模式色谱柱洗脱芳基硫酸酯酶A包括洗脱峰值采集的一个或多个步骤。例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),例如,洗脱峰值采集由上升侧处约50mAU开始到下降侧处约50mAU,例如,上升侧处约100mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约200mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约100mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约200mAU或者上升侧处约100mAU到下降侧处约100mAU。

[0199] 本文所述的装载缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液可包括一种或多种缓冲液。例如,缓冲液可以为TRIS、HEPES、MOPS、PIPES、SSC、MES,磷酸钠、醋酸钠或其组合。缓冲液的浓

度介于约1mM至约500mM之间,例如,介于约10mM至约250mM之间;介于约20mM至约100mM之间,介于约1mM至5mM之间;介于约5mM至10mM之间;介于约10mM至50mM之间;或者介于约50mM至约100mM之间;例如,约1mM、约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM。

[0200] 在一些实施方案中,通过混合模式色谱对ASA的纯化在离子交换色谱(例如,阴离子交换色谱)纯化之后进行。然而,预期这些步骤可以相反顺序进行。

[0201] 混合模式色谱之后的产率可改变。在一些实施方案中,芳基硫酸酯酶A活性产率为至少约80%,例如,至少约90%,例如,介于约80%至约115%之间。在一些实施方案中,例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),蛋白产率(AU或吸光度单位)为约30%至80%,例如,约35%至约75%或者约50%至约70%。

[0202] 混合模式色谱之后纯度得到较大改善。在一些实施方案中,例如,如通过本文所述方法测定,经纯化的芳基硫酸酯酶A的比活性为至少约50U/mg至约140U/mg,例如,至少约70U/mg、至少约90U/mg、至少约100U/mg或至少约120U/mg。在一些实施方案中,将芳基硫酸酯酶A纯化为至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%或至少约99.9%。通过例如以下一种或多种方法可测定芳基硫酸酯酶A的纯度:宿主细胞蛋白(HCP)蛋白质印迹法、SDS-PAGE Coomassie染色法、SDS-PAGE银染色、反相HPLC和尺寸排阻HPLC。在一些实施方案中,宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)介于约0.3至约0.6之间,例如,介于约0.4至0.5之间。

[0203] 疏水相互作用色谱(HIC)

[0204] 本文所述的纯化方法可包括使芳基硫酸酯酶A的样品进行疏水相互作用色谱(HIC)。在一个实施方案中,疏水相互作用色谱包括苯基色谱。在其他实施方案中,疏水相互作用色谱包括丁基色谱或辛基色谱。在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行HIC为在约23℃或更低、约18℃或更低或者约16℃或更低的温度下(例如,约23℃、约20℃、约18℃或约16℃)进行。在一些实施方案中,在HIC之前使芳基硫酸酯酶A的样品进行混合模式色谱。

[0205] 疏水相互作用色谱利用用于极性或非极性环境的给定分子的吸附,并且根据蛋白,该倾向通过在蛋白暴露外表面上残基的疏水性或亲水性来支配。因此,根据蛋白对疏水性基质(通常为具有2-18个碳链长烷基连接臂的惰性载体)的不同吸附程度来分级它们。固定相由连接亲水性聚合物主链(例如,交联的Sepharose™、葡聚糖或琼脂糖)的小的非极性基团(丁基、辛基或苯基)组成。因此,HIC柱通常是丁基SEPHAROSE™柱或苯基SEPHAROSE™柱,最常为苯基SEPHAROSE™柱。在一些实施方案中,疏水相互作用色谱包括使用以下一种或多种的苯基色谱:苯基SEPHAROSE™高性能、苯基SEPHAROSE™6快速流(低分辨率)或苯基SEPHAROSE™6快速流(高分辨率)。

[0206] 在一些实施方案中,使芳基硫酸酯酶A的样品进行疏水相互作用色谱包括:将芳基硫酸酯酶A的样品装载到HIC柱上;洗涤HIC柱;以及由柱中洗脱芳基硫酸酯酶A。在HIC中装载、洗涤和洗脱基本上按照如上所述离子交换色谱的相同原则,但是通常应用与离子交换色谱中使用的那些条件几乎相反的条件。因此,HIC过程包括使用高盐装载缓冲液,它拆开蛋白以暴露疏水性位点。通过在柱上的疏水性配体来保留蛋白,并且将蛋白暴露于包含盐浓度梯度降低的缓冲液。当盐浓度降低时,蛋白回到它的天然构象,并且最终由柱中洗脱。作为另外一种选择,可使用PEG洗脱蛋白。

[0207] 在一些实施方案中,使用装载缓冲液进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到HIC柱上。在一个实施方案中,装载缓冲液含有氯化钠。例如,装载缓冲液的氯化钠浓度为约0.5M至约2.5M,例如,约1M或约1.5M。在另一实施方案中,装载缓冲液含有磷酸钠。例如,装载缓冲液的磷酸钠浓度为约10mM至约100mM,例如,约25mM、约50mM或约75mM。在一些实施方案中,在约5至约7(例如,约5.5至约6.5,例如,约5.5、约6.0或约6.5)的pH下进行将芳基硫酸酯酶A的样品装载到HIC柱上。在一些实施方案中,在约12AU/L树脂或更小(例如,约10AU/L树脂或更小、约9AU/L树脂或更小、约7AU/L树脂或更小、或约5AU/L树脂或更小;例如,介于约5AU/L树脂至约9AU/L树脂之间或者介于约5AU/L树脂至约7AU/L树脂之间)的结合容量下将芳基硫酸酯酶A的样品装载到HIC柱上。

[0208] 在HIC中作为固相使用苯基SEPHAROSE™在本公开中常见。再者,显而易见,就用于装载、洗涤和洗脱处理的精确条件和缓冲液与缓冲液组合而言,存在大量不同的可能性。在典型实施方案中,可在含有0.05M NaPO₄, 1M NaCl, pH 5.5的缓冲液中平衡柱。为了方便,可将样品装载在纯化工艺之前步骤的缓冲液中,或者使用装载缓冲液可装载样品。

[0209] 在一些实施方案中,使用一种或多种洗涤缓冲液进行HIC柱的洗涤。例如,洗涤HIC柱可包括两个或多个(例如,第一和第二)洗涤步骤,每一步骤均使用不同的洗涤缓冲液。在一些实施方案中,洗涤缓冲液含有氯化钠。例如,洗涤缓冲液的氯化钠浓度为约100mM至约1.5M,例如,约250mM至约1M;例如,约250mM、约500mM、约750mM或约1M。在另一实施方案中,洗涤缓冲液含有磷酸钠。例如,装载缓冲液的磷酸钠浓度为约10mM至约100mM,例如,约25mM、约50mM或约75mM。在一些实施方案中,在约5至约7(例如,约5.5至约6.5,例如,约5.5、约6.0或约6.5)的pH下进行HIC柱的洗涤。例如,使用平衡缓冲液的1-2柱洗涤液、然后为1-5柱体积的0.02M MES, 0.05M NaPO₄, 0.5M NaCl, pH 5.5可进行洗涤。作为另外一种选择,使用用于HIC的本文所述的任何其他平衡、装载和洗涤缓冲液可平衡、装载和洗涤柱。

[0210] 在一些实施方案中,使用洗脱缓冲液进行由HIC柱洗脱芳基硫酸酯酶A。在一些实施方案中,洗脱缓冲液包含氯化钠。例如,洗脱缓冲液的氯化钠浓度为约30mM至约100mM,例如,约45mM至约85mM;例如,约50mM、约60mM、约70mM或约80mM。在一些实施方案中,在约5至约9(例如,约6至约8,例如,约7)的pH下进行由HIC柱洗脱芳基硫酸酯酶A。例如,使用0.02M MES-Tris, 0.06M NaCl, pH 7.0可进行芳基硫酸酯酶A的洗脱。作为另外一种选择,在用于HIC的本文所述的任何其他洗脱缓冲液中可洗脱样品。

[0211] 在一些实施方案中,由HIC柱洗脱芳基硫酸酯酶A包括洗脱峰值采集的一个或多个步骤。例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),例如,洗脱峰值采集由上升侧处约50mAU开始到下降侧处约50mAU,例如,上升侧处约100mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约200mAU到下降侧处约50mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约100mAU;上升侧处约50mAU到下降侧处约200mAU或者上升侧处约100mAU到下降侧处约100mAU。

[0212] 在一些实施方案中,通过HIC的芳基硫酸酯酶A的纯化在通过离子交换色谱(例如,阴离子交换色谱)和/或混合模式色谱的纯化之后进行。然而,预期这些步骤可以相反顺序进行。

[0213] 本文所述的装载缓冲液、洗涤缓冲液和洗脱缓冲液可包括一种或多种缓冲液。例如,缓冲液可以为TRIS、HEPES、MOPS、PIPES、SSC、MES, 磷酸钠、醋酸钠或其组合。缓冲液的浓度介于约1mM至约500mM之间,例如,介于约10mM至约250mM之间;介于约20mM至约100mM之

间,介于约1mM至5mM之间;介于约5mM至10mM之间;介于约10mM至50mM之间;或者介于约50mM至约100mM之间;例如,约1mM、约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM。

[0214] HIC之后的产率可改变。在一些实施方案中,芳基硫酸酯酶A活性产率为至少约60%,例如,至少约70%,例如,介于约70%至约100%之间。在一些实施方案中,例如,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),蛋白产率(AU或吸光度单位)为约45%至100%,例如,约50%至约95%或者约55%至约90%。

[0215] HIC之后纯度得到较大改善。在一些实施方案中,例如,如通过本文所述方法测定,经纯化的芳基硫酸酯酶A的比活性为至少约50U/mg至约140U/mg,例如,至少约70U/mg、至少约90U/mg、至少约100U/mg或至少约120U/mg。

[0216] 在一些实施方案中,将芳基硫酸酯酶A纯化为至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%或至少约99.9%。通过例如以下一种或多种方法可测定芳基硫酸酯酶A的纯度:宿主细胞蛋白(HCP)蛋白质印迹法、SDS-PAGE Coomassie染色、SDS-PAGE银染色、反相HPLC和尺寸排阻HPLC。在一些实施方案中,宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)介于约0.6至约1.2之间,例如,介于约0.7至0.95之间。

[0217] 超滤/渗滤

[0218] 本文所述的纯化方法可包括下游超滤和/或渗滤的一个或多个步骤。在一些实施方案中,本方法还包括例如通过超滤和/或渗滤(例如,通过切向流超滤)浓缩和/或过滤芳基硫酸酯酶A的样品。

[0219] 超滤是指通过压力梯度驱动膜分离过程,其中膜根据液体组分的溶剂化大小和结构来分离它们。渗滤是超滤方法的特定类型,在渗滤中使用水稀释保留物,然后再超滤,从而减少可溶性渗透组分的浓度和进一步增加保留的组分的浓度。通常将超滤与渗滤合并为超滤/渗滤(UFDF)纯化步骤。

[0220] 本发明的实施方案利用至少一个、至少两个、至少三个或更多个下游UFDF纯化步骤。一个或多个渗滤可在UFDF步骤(例如,UFDFDF)内发生。在一些实施方案中,如通过分光光度法测定(例如,在280nm下),与纯化步骤之前的量相比,下游UFDF之后蛋白产率(AU或吸光度单位)为约90%至105%,例如,约95%至约100%,例如,约97%至约99%。在一些实施方案中,在UFDF中基本上没有损耗蛋白。

[0221] 在本发明的一些实施方案中,下游UFDF得到如通过尺寸排阻色谱-高效液相色谱(SEC-HPLC)和/或反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定的至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或更纯的rASA。在一些实施方案中,将芳基硫酸酯酶A纯化为至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%或至少约99.9%。通过例如以下一种或多种方法可测定芳基硫酸酯酶A的纯度:宿主细胞蛋白(HCP)蛋白质印迹法、SDS-PAGE Coomassie染色、SDS-PAGE银染色、反相HPLC和尺寸排阻HPLC。例如,如通过如下所述的硫酸酯酶释放测定法测定的rASA的比活性为至少约60U/mg至约100U/mg,例如,至少约65U/mg、至少约90U/mg、至少约70U/mg或至少约90U/mg。

[0222] 在一些实施方案中,在酸性环境中根据污染物大小通过切向流过滤由污染物中通过分离来纯化芳基硫酸酯酶A。在低pH下芳基硫酸酯酶A形成具有480kDa理论分子量的八聚合体,因而被相对开放式膜保留,而大部分污染物将通过该膜(Sommerlade等人,(1994))

Biochem.J.,297;123-130;Schmidt等人,(1995)Cell,82 271-278;Lukatela等人,(1998) Biochemistry,37,3654-3664)。

[0223] 在典型实施方案中,渗滤缓冲液包含0.01M磷酸钠-柠檬酸盐,0.137M NaCl,pH 6.0。

[0224] 在一些实施方案中,当用于该工艺的原材料为在工艺之前步骤中从色谱柱洗脱的芳基硫酸酯酶A的悬浮液时,则通过加入0.2-1M醋酸钠pH 4.5来调节在该悬浮液中pH。然后以本领域技术人员众所周知的方式通过1-10缓冲液体积的醋酸钠pH 4-5来进行渗滤。可应用标称量截留值范围为20-450kDa的多种不同过滤器类型来进行过滤,但是通常使用截留值范围为100-300kDa的过滤器。为了进一步处理包含芳基硫酸酯酶A的溶液,通过加入Tris-碱到大约20-50mM的最终浓度,将pH调节到范围介于7至8之间值。

[0225] 作为如上所述的酸性切向流过滤的替代形式,使用基本上相同条件和缓冲液组合物,经酸性凝胶过滤可得到由污染物中分离ASA。在低pH下通过凝胶过滤柱来进行过滤,该凝胶过滤柱在低pH下使用溶液(例如,在pH 4-5下醋酸钠的0.2-0.9M溶液)已经平衡。作为选择,在凝胶过滤之前通过20-50kDa过滤器的切向流过滤可浓缩芳基硫酸酯酶A的溶液。浓度范围可相当大程度变化,使得可将芳基硫酸酯酶A由约0.1mg/ml浓缩到约50mg/ml,优选浓缩到约5mg/ml。

[0226] 在一些实施方案中,通过Biomax A-screen,30kDa来浓缩样品合并物。通过20mM醋酸钠,pH 5.4-5.7的3-5柱洗涤液来进行渗滤。

[0227] 经纯化的ASA蛋白的鉴定

[0228] 使用各种方法可鉴定经纯化的重组ASA蛋白。

[0229] 纯度

[0230] 通常通过在最终产品中存在的各种杂质(例如,宿主细胞蛋白或宿主细胞DNA)的水平来测定经纯化的重组ASA蛋白的纯度。例如,通过ELISA或SDS-PAGE可测定宿主细胞蛋白(HCP)水平。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA蛋白含有小于150ng HCP/mg ASA蛋白(例如,小于140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、30、20、10ng HCP/mg ASA蛋白)。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA蛋白含有小于约150pg/mg、140pg/mg、130pg/mg、120pg/mg、110pg/mg、100pg/mg、90pg/mg、80pg/mg、70pg/mg、60pg/mg、50pg/mg、40pg/mg、30pg/mg、20pg/mg或10pg/mg宿主细胞DNA。

[0231] 在一些实施方案中,当使用Coomassie亮蓝染色进行SDS-PAGE时,经纯化的重组ASA蛋白没有强度大于0.05%、0.01%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%或0.5%测定法对照的新谱带。在一些实施方案中,当使用蛋白质印迹法对HCP进行SDS-PAGE时,经纯化的重组ASA蛋白没有强度大于测定法对照15kDa的HCP谱带,并且没有强度大于0.05%、0.01%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%、0.5%或1.0%测定法对照的新谱带。在一些实施方案中,当使用银染色进行SDS-PAGE时,经纯化的重组ASA蛋白没有强度大于0.05%、0.01%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%或0.5%测定法对照的新谱带。在一些实施方案中,宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)介于约0.3和约0.6之间,例如,介于约0.4和0.5之间。可使用各种测定法对照,尤其是审批部门例如FDA可接受的那些测定法。

[0232] 通过尺寸排阻色谱-高效液相色谱(SEC-HPLC)、毛细管电泳-SDS PAGE(CE-SDS

PAGE)和/或反相-高效液相色谱(RP-HPLC)(例如,使用十八烷基(C18)-键合硅的柱,并且在酸性pH下使用TFA作为抗衡离子来进行)的一种或多种也可测定经纯化的重组ASA蛋白的纯度。在本发明的一些实施方案中,在色谱图中主峰为ASA。可改变或优化以增加分辨率的参数包括梯度条件、有机改性剂、抗衡离子、温度、柱孔径和粒径、组成和流速。如本领域技术人员已知,通过主峰百分比可辨别纯度水平。例如,通过积分观察到的主峰和侧峰以及计算总面积中主峰的百分比可测定纯度。在本发明的一些实施方案中,通过本文所公开的方法纯化和如通过SEC-HPLC的主峰百分比测定的ASA的纯度大于或等于95%(例如,约96%、约97%、约98%、约99%或更高)。在本发明的一些实施方案中,通过本文所公开的方法纯化和如通过RP-HPLC的主峰百分比测定的ASA的纯度大于或等于98%(即,约98%、约99%或更高)。

[0233] 比活性

[0234] 通过评估功能和/或生物活性也可特征化经纯化的重组ASA蛋白。使用本领域已知的方法可测定重组ASA组合物的酶活性。通常,本方法包括检测由合成底物中硫酸盐的去除,该方法被称为硫酸盐释放测定法。酶活性测定法的一个例子包括离子色谱的使用。该方法量化通过重组ASA由底物中酶释放的硫酸根离子的量。底物可以为天然底物或合成底物。在一些情况下,底物是硫酸肝素、硫酸皮肤素或其功能等同物。通常,通过使用传导性检测器的离子色谱来分析释放的硫酸根离子。在该例子中,结果可以表示为U/mg的蛋白,其中1单位表示由底物中每小时释放1微摩尔的硫酸根离子所需要的酶量。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA具有至少约50U/mg、60U/mg、70U/mg、80U/mg、90U/mg、100U/mg、110U/mg、120U/mg、130U/mg、140U/mg的比活性。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA具有范围为约50-200U/mg(例如,约50-190U/mg、50-180U/mg、50-170U/mg、50-160U/mg、50-150U/mg、50-140U/mg、50-130U/mg、50-120U/mg、50-110U/mg、50-100U/mg、60-200U/mg、60-190U/mg、60-180U/mg、60-170U/mg、60-160U/mg、60-150U/mg、60-140U/mg、60-130U/mg、60-120U/mg、60-110U/mg、60-100U/mg、70-200U/mg、70-190U/mg、70-180U/mg、70-170U/mg、70-160U/mg、70-150U/mg、70-140U/mg、70-130U/mg、70-120U/mg、70-110U/mg、70-100U/mg、80-200U/mg、80-190U/mg、80-180U/mg、80-170U/mg、80-160U/mg、80-150U/mg、80-140U/mg、80-130U/mg、80-120U/mg、80-110U/mg、80-100U/mg、90-200U/mg、90-190U/mg、90-180U/mg、90-170U/mg、90-160U/mg、90-150U/mg、90-140U/mg、90-130U/mg、90-120U/mg、90-110U/mg、90-100U/mg、100-200U/mg、100-190U/mg、100-180U/mg、100-170U/mg、100-160U/mg、100-150U/mg、100-140U/mg、100-130U/mg、100-120U/mg、100-110U/mg、110-200U/mg、110-190U/mg、110-180U/mg、110-170U/mg、110-160U/mg、110-150U/mg、110-140U/mg、110-130U/mg、110-120U/mg、120-200U/mg、120-190U/mg、120-180U/mg、120-170U/mg、120-160U/mg、120-150U/mg、120-140U/mg、120-130U/mg、130-200U/mg、130-190U/mg、130-180U/mg、130-170U/mg、130-160U/mg、130-150U/mg或130-140U/mg)的比活性。

[0235] 在另一例子中,通过测量由4-甲基伞形酮基-硫酸酯(4-MUF-硫酸酯)底物中硫酸盐去除以形成荧光甲基伞形酮可测定重组ASA组合物的酶活性。在该例子中,使用4-MUF的标准品,通过测试样品生成的荧光信号可用于计算酶活性(以mU/mL计)。一毫单位活性定义为在37℃下1分钟下转化1纳摩尔4-MUF-硫酸酯为4-MUF所需要的酶量。然后通过将酶活性除以蛋白浓度可计算比活性。

[0236] 在一些实施方案中,通过具有吸收在515nm处光的终产物对硝基儿茶酚(pNC)的合成显色底物对硝基儿茶酚硫酸盐(pNCS)的水解来测定活性。以下等式可用于计算酶活性:以摩尔计的水解的pNCS/min \times ml(=单位/ml):

[0237] $V_{\text{总}}(\text{ml}) \times \Delta A = \text{单位/ml (1)}$

[0238] $\epsilon M/1000 \times V_{\text{样品}}(\text{ml}) \times \text{孵育时间}(\text{min})$, 其中:

[0239] $\Delta A = \text{样品的吸光度} - \text{空白的吸光度}$

[0240] $V_{\text{总}}(\text{ml}) = \text{以ml计的总反应体积(在该情况下为0.15ml)}$

[0241] $V_{\text{样品}}(\text{ml}) = \text{以ml计的加入的样品(在该情况下为0.05ml)}$

[0242] $\epsilon M = \text{产品pNC的摩尔吸光系数,在该情况下其为12400M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

[0243] 等式1可以简化为:

[0244] $\Delta A \times (0.15 / (12400 / 1000 \times 0.05 \times 30)) =$

[0245] $X_{\mu\text{mol}} / (\text{分钟} \times \text{ml}) (= \text{单位/ml}) (1)$

[0246] 为了计算以消耗的 $\mu\text{mol pNC} / (\text{分钟} \times \text{mg}) (= \text{单位/mg})$ 计的比活性,将等式1除以样品的蛋白浓度:

[0247] 等式1/蛋白浓度(mg/ml) = $Y_{\mu\text{mol}} / (\text{分钟} \times \text{mg}) = \text{单位/mg (2)}$

[0248] 在任何例子中,通过用于测定蛋白浓度的本领域已知的任何合适方法可测定重组ASA组合物的蛋白浓度。在一些情况下,通过紫外光吸光度测定法来测定蛋白浓度。这些吸光度测定法通常在约280nm波长(A280)下进行。

[0249] 在一些实施方案中,经纯化的重组ASA在4-甲基伞形酮底物上具有范围为约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $100.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $50.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $40.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $30.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $20.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $10.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $4.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $8.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $4.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $10.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $4.5 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $10.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $5.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $10.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $5.5 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $15.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 或者约 $4.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 至 $20.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 的比活性。在一些实施方案中,经纯化的重组ASA在4-甲基伞形酮底物上具有约 $1.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $2.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $3.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $4.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $5.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $10.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $15.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $20.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $25.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $30.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $35.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $40.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $45.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 、约 $50.0 \times 10^3 \text{mU/mg}$ 或更大的比活性。

[0250] 电荷曲线

[0251] 与蛋白相关的电荷曲线可特征化经纯化的重组ASA。通常,蛋白电荷曲线反馈残基侧链电荷(通常存在于蛋白表面上)的图谱。通过在蛋白上进行离子交换(IEX)色谱(例如,HPLC)可测定电荷曲线。在一些实施方案中,“电荷曲线”是指表示在加入含有交换离子的流动相柱之后在时间点处由离子交换柱中洗脱的蛋白的量的一组值。

[0252] 通常,合适的离子交换柱为阴离子交换柱。例如,通过使用高效液相色谱(HPLC)体系的强阴离子交换(SAX)色谱可测定电荷曲线。通常,重组ASA吸附在强阴离子交换柱的固定正电荷上,并且使用在预定流速下的流动相的离子强度增加的梯度洗脱来自与带正电荷柱之间离子相互作用强度成比例的柱的重组ASA种类。带负电更多(酸性更强)的ASA种类比带负电更少(酸性更弱)的ASA种类洗脱更晚。通过紫外光吸光度(在280nm下)来检测在洗脱液中蛋白的浓度。

[0253] 在一些实施方案中,在约pH 8.0下在20mM TRIS-HCl中,重组ASA吸附到Mini Q PE柱的固定正电荷上,并且使用在0.8ml/min流速下由20mM TRIS-HCL,1M氯化钠,pH 8.0组成的流动相的离子强度增加的梯度洗脱来自与带正电荷的柱之间离子相互作用强度成比例的柱的重组ASA种类。

[0254] 在一些实施方案中,通过在HPLC柱洗脱之后吸光度单位比时间的色谱图可示出电荷曲线。色谱图可包括一个或多个峰的组,在该组中各个峰标识具有类似表面电荷的组合物的重组ASA亚群。

[0255] 聚糖图谱

[0256] 在一些实施方案中,通过经纯化的重组ASA蛋白的蛋白聚糖组成(通常称为聚糖图谱)可特征化经纯化的重组ASA蛋白。不受任何理论的限制,据认为,聚糖键和分支结构的形状和复杂度可影响体内清除、溶酶体靶向、生物利用度和/或效能。

[0257] 通常,通过酶消化和随后色谱分析可测定聚糖图谱。各种酶可用于酶消化,这些酶包括但不限于合适的糖基化酶、肽酶(例如,内肽酶、外肽酶)、蛋白酶和磷酸酶。在一些实施方案中,合适的酶为碱性磷酸酶。在一些实施方案中,合适的酶为神经氨酸酶。通过色谱分析可检测聚糖(例如,磷酸聚糖)。例如,通过使用脉冲安培检测的高效阴离子交换色谱(HPAE-PAD)或尺寸排阻高效液相色谱(HPLC)可检测磷酸聚糖。根据本领域已知和本文公开的方法,使用聚糖(例如,磷酸聚糖)的标准曲线可计算在聚糖图谱上各峰表示聚糖(例如,磷酸聚糖)的量。

[0258] 在一些实施方案中,根据本发明的经纯化的重组ASA蛋白的特征在于包括分别指示中性(峰值基团1)、一唾液酸化(峰值基团2)、封端的甘露糖-6-磷酸化(峰值基团3)、二唾液酸化(峰值基团4)、一甘露糖-6-磷酸化(峰值基团5)、杂化(峰值基团6)和二甘露糖-6-磷酸化(峰值基团7)ASA蛋白的至少七个峰值基团的聚糖图谱。

[0259] 肽图谱

[0260] 在一些实施方案中,肽图谱可用于特征化氨基酸组成、翻译后修饰和/或细胞加工;例如信号肽的切割和/或糖基化。通常,通过受控或随机破坏可使重组蛋白断裂为离散的肽片段,从而产生图案或肽图。在一些情况下,在解析性分析之前可将纯化的ASA蛋白进行酶消化。在解析性分析之前,可使用肽酶、糖苷水解酶、磷酸酶、脂肪酶或蛋白酶和/或其组合进行消化。使用本领域众所周知的方法可测定肽的结构组成。示例性方法包括但不限于质谱测定法、核磁共振(NMR)或者HPLC。

[0261] 金属分析

[0262] 在一些实施方案中,通过金属分析可特征化经纯化的重组ASA蛋白。在经纯化的药用物质中分析痕量金属的各种方法是本领域已知的,并且可用于本发明的实施中。

[0263] 在一些实施方案中,测定残余磷,并且与参比样品比较。不受任何具体理论的限制,设想残余磷有助于维持药用物质pH。在本发明的一些实施方案中,残余磷介于约10-50ppm之间(即,介于约10-45ppm、约10-40ppm、约10-30ppm、约20-50ppm、约20-45ppm、约20-40ppm、约20-30ppm、约30-50ppm、约30-40ppm)。在一些实施方案中,根据本文所公开的方法纯化的重组ASA的pH范围介于约5-7之间(即,介于约5.5-7.0、约5.5-6.5、约5.5-6.0、约6.0-7.0、约6.0-6.5、约6.0-6.4、约6.0-6.3、约6.0-6.2、约6.0-6.1、约6.1-6.2之间)。

[0264] 在一些实施方案中,根据本文所公开的方法纯化的重组ASA含有钙。不受任何具体

理论的限制,设想存在于ASA的活性位点的钙离子可能对酶活性是必需的。在本发明的一些实施方案中,钙以介于约1-20ppm之间(即,介于约1-15ppm、约1-10ppm、约5-15ppm、约5-10ppm、约10-20ppm、约10-15ppm、约10-14ppm、约10-13ppm、约10-12ppm之间)的水平存在。

[0265] 药物组合物和施用

[0266] 依据已知方法可向MLD患者施用经纯化的重组ASA蛋白。例如,经纯化的重组ASA蛋白可以静脉内、皮下、肌肉内、肠道外、透皮或经粘膜(例如,口服或经鼻腔)递送。

[0267] 在一些实施方案中,通过静脉内施用将重组ASA或含有其的药物组合物向受试者施用。

[0268] 在一些实施方案中,通过鞘内施用将重组ASA或含有其的药物组合物向受试者施用。如本文所使用,术语“鞘内施用”或者“鞘内注射”是指注射进入脊椎管(围绕脊髓的鞘内空间)。可使用包括但不限于通过钻孔的侧脑室注射或者合并物穿刺或腰椎穿刺等的各种技术。在一些实施方案中,根据本发明的“鞘内施用”或“鞘内递送”是指通过腰椎区或区域的IT施用或递送,即,腰椎IT施用或递送。如本文所使用,术语“腰椎区域”是指介于第三和第四腰椎(下背部)椎骨之间的区域,更加总括而言,脊柱的L2-S1区域。在一些实施方案中,通过如在通过引用全部并入本文中的PCT国际申请W02011/163648和W02011/163650中所述的鞘内施用将重组ASA或含有其的药物组合物向受试者施用。

[0269] 在一些实施方案中,通过皮下(即,在皮肤下面)施用将重组ASA或含有其的药物组合物向受试者施用。为此目的,使用注射器可注射制剂。然而,可获得施用制剂的其他装置,例如注射装置(例如,Inject-ease和Genject装置);注射笔(例如GenPen);无针装置(例如,MediJector和BioJector);和皮下贴剂递送体系。

[0270] 在一些实施方案中,可联合其他施用途径(例如,静脉内、皮下、肌肉内、肠道外、透皮或经粘膜(例如,口服或经鼻腔))进行鞘内施用。

[0271] 本发明涵盖治疗有效量的本文所述的重组ASA或含有其的药物组合物的单一施用以及多种施用。取决于受试者病症(例如,溶酶体贮积病)的性质、严重性和程度,可以规律时间间隔施用重组ASA或含有其的药物组合物。在一些实施方案中,可以在规律时间间隔(例如,一年一次、六个月一次、五个月一次、三个月一次、双月一次(两个月一次)、每月一次(一个月一次)、双周一次(两周一次)、一周一次、一日一次或持续)下定期施用治疗有效量的重组ASA或含有其的药物组合物。

[0272] 使用生理上可接受的载体或赋形剂可配制重组ASA或含有其的药物组合物以制备药物组合物。载体和治疗剂可以为无菌的。配制应当适合施用方式。

[0273] 合适的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液(例如,NaCl)、盐水、缓冲盐水、醇、甘油、乙醇、阿拉伯胶、植物油、苧醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(例如乳糖、直链淀粉或淀粉)、糖(例如甘露醇、蔗糖或其他糖)、右旋糖、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等及其组合。如果需要,可将药物制品与不会有害地影响活性化合物或者干扰它们活性的助剂(例如,润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、影响渗透压的盐类、缓冲液、着色剂、调味剂和/或芳香物质等)混合。在一些实施方案中,使用适合静脉内施用的水溶性载体。

[0274] 如果需要,组合物或药剂也可含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲液。组合物可以为液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末。使用常见粘合剂和载体

(例如甘油三酯)也可将组合物配制为栓剂。口服制剂可包括标准载体,例如药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁聚乙炔基吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0275] 依据适于人类施用的药物组合物常规工序可配制组合物或药剂。例如,在一些实施方案中,用于静脉内施用的组合物通常为在无菌等渗水性缓冲液中溶液。在必要处,组合物也可包括增溶剂和缓解注射部位疼痛的局部麻醉剂。一般来说,成分可单独或混合至一起以单位剂型来提供,例如,如在指示活性剂量的诸如安瓿或小袋(sachette)的密封容器中的干冻粉或无水浓缩物。在通过输液施用组合物的情况下,可使用含有无菌药用级别水、盐水或右旋糖/水的输液瓶来分散该组合物。在通过注射施用组合物的情况下,可提供注射用无菌水或者盐水的安瓿,从而使得在施用之前可混合成分。

[0276] 在一些实施方案中,在等渗溶液(例如154mM NaCl或者0.9%NaCl和10-50mM磷酸钠pH 6.5-8.0或者磷酸钠、甘氨酸、甘露醇或对应钾盐)中配制芳基硫酸酯酶A。在另一实施方案中,在生理缓冲液中配制ASA,例如:

[0277] a) 含有以下的配制缓冲液I(以mM计): Na_2HPO_4 (3.50-3.90)、 NaH_2PO_4 (0-0.5)、甘氨酸(25-30)、甘露醇(230-270)和注射用水;或

[0278] b) 含有以下的配制缓冲液II(以mM计):Tris-HCl(10)、甘氨酸(25-30)、甘露醇(230-270)和注射用水。

[0279] 通过本文方法纯化的芳基硫酸酯酶A可用作在患有和/或被诊断为异染性脑白质营养不良的受试者中减少在周围神经系统细胞内和/或中枢神经系统内鞘脂3-O-硫酸半乳糖基酰基鞘氨醇(半乳糖基磷脂)水平的药剂。ASA的施用将导致运动学习技能损伤降低和神经运动传导速度和/或神经传导幅度增加。如本文所使用,术语“治疗有效量”主要根据在本发明的药物组合物中含有的治疗剂的总量来确定。一般来说,治疗有效量足以使受试者得到有意义的好处(例如,治疗、调整、治愈、预防和/或缓解原发疾病或病症)。例如,治疗有效量可以为足以达到所需治疗和/或预防效果的量,例如足以调整溶酶体酶受体或它们的活性以治疗这类溶酶体贮积病或其症状(例如,在向受试者施用本发明的组合物之后降低或消除“斑马小体”或细胞液泡化的出现或发生率)的量。一般来说,向需要治疗剂(例如,重组溶酶体酶)的受试者中施用其的量取决于受试者的特征。这些特征包括受试者的病症、疾病严重性、一般健康情况、年龄、性别和体重。本领域普通技术人员根据这些和其他相关因素能够容易地确定合适的剂量。此外,可任选采用客观和主观测定法来确定最佳剂量范围。

[0280] 治疗有效量通常在可包括多个单位剂量的给药方案中施用。对于任何特定蛋白,例如,取决于施用途径、与其他药物制品的联用,治疗有效量(和/或在有效给药方案内合适的单位剂量)可改变。而且,任何特定患者的具体治疗有效量(和/或单位剂量)可取决于各种因素,这些因素包括待治疗的疾患和疾患严重性;所采用的具体药物制品的活性;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康情况、性别和饮食;施用时间、施用途径和/或所采用的具体融合蛋白的排泄率或代谢;治疗持续时间等如医学领域众所周知的因素。

[0281] 进一步理解,对于任何特定受试者,具体剂量方案应当根据个体需要和施用者或酶替代疗法施用的监控者的专业判断来调整,并且本文所示的剂量范围仅示例,不期望用于限制所要求的本发明的范围或实施。

[0282] 本文还包括以下实施方案:

[0283] 实施方案1.一种纯化重组芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白的方法,所述方法包括

- [0284] 通过进行一个或多个色谱步骤从不纯制品中纯化重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白；
- [0285] 合并来自所述一个或多个色谱步骤的洗脱液；
- [0286] 调节合并的洗脱液的pH到约6.0或大于约6.0的pH；和
- [0287] 对经调节pH的洗脱液进行超滤和/或渗滤。
- [0288] 实施方案2.实施方案1所述的方法，其中将所述pH调节到约6.0。
- [0289] 实施方案3.实施方案1或2所述的方法，其中使用pH 7.0的包含磷酸钠、氯化钠和柠檬酸钠的缓冲液来调节所述pH。
- [0290] 实施方案4.实施方案3所述的方法，其中所述缓冲液包含约0.1-0.5M磷酸钠、0.5-2.5M氯化钠和0.1-0.6M柠檬酸钠，所述缓冲液的pH为7.0。
- [0291] 实施方案5.前述实施方案中任一项所述的方法，其中在超滤和渗滤步骤之前进行病毒过滤。
- [0292] 实施方案6.前述实施方案中任一项所述的方法，其中进行超滤和/或渗滤的单一步骤。
- [0293] 实施方案7.实施方案5所述的方法，其中所述超滤和/或渗滤的单一步骤仅包括一次渗滤。
- [0294] 实施方案8.前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述超滤为切向流超滤。
- [0295] 实施方案9.前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述一个或多个色谱步骤包括阳离子交换色谱。
- [0296] 实施方案10.实施方案9所述的方法，其中所述阳离子交换色谱是最后的色谱步骤并且在调节pH之前合并来自所述阳离子交换色谱的洗脱液。
- [0297] 实施方案11.实施方案10所述的方法，其中在进行所述阳离子交换色谱之前进行阴离子交换色谱、混合模式色谱和疏水相互作用色谱中的一种或多种。
- [0298] 实施方案12.实施方案11所述的方法，其中所述阴离子交换色谱为Q色谱。
- [0299] 实施方案13.实施方案11所述的方法，其中所述阴离子交换色谱包括TMAE树脂。
- [0300] 实施方案14.实施方案13所述的方法，其中一旦装载不纯制品，则使用pH 7.0、包含MES-Tris的第一洗涤缓冲液来洗涤所述TMAE树脂。
- [0301] 实施方案15.实施方案14所述的方法，其中所述第一洗涤缓冲液包含约20-75mM MES-Tris。
- [0302] 实施方案16.实施方案13-15中任一项所述的方法，其中使用pH7.0、包含MES-Tris和NaCl的第二洗涤缓冲液来洗涤所述TMAE树脂。
- [0303] 实施方案17.实施方案16所述的方法，其中所述第二洗涤缓冲液包含约5-75mM MES-Tris和约50-150mM NaCl，所述第二缓冲液的pH为7.0。
- [0304] 实施方案18.实施方案13-17中任一项所述的方法，其中一旦装载不纯制品，则使用pH 7.0、包含MES-Tris和NaCl的洗脱缓冲液来洗脱所述TMAE树脂。
- [0305] 实施方案19.实施方案18所述的方法，其中所述洗脱缓冲液包含约5-75mM MES-Tris和约150-300mM NaCl，所述洗脱缓冲液的pH为7.0。
- [0306] 实施方案20.实施方案11所述的方法，其中所述阴离子交换色谱利用选自以下组成的组的柱：Q Sepharose™快速流柱、Q Sepharose™高性能柱、Q Sepharose™ XL、Capto™ Q、DEAE、TOYOPEARL GigaCap® Q、Fractogel® TMAE、Eshmuno™ Q、Nuvia™ Q或者

UNOsphere™ Q。

[0307] 实施方案21.实施方案11-20中任一项所述的方法,其中所述混合模式色谱为羟磷灰石(HA)色谱。

[0308] 实施方案22.实施方案11-21中任一项所述的方法,其中所述疏水相互作用色谱为苯基色谱。

[0309] 实施方案23.实施方案9-22中任一项所述的方法,其中进行一个或多个色谱步骤包括以如下顺序进行使用TMAE树脂的阴离子交换色谱、HA色谱、苯基色谱和阳离子交换SP色谱。

[0310] 实施方案24.实施方案9-23中任一项所述的方法,其中所述阴离子交换色谱包括使用具有大于约4.5g/L装载容量的柱。

[0311] 实施方案25.实施方案24所述的方法,其中所述柱的装载容量为约5-20g/L。

[0312] 实施方案26.前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述不纯制品的超滤在上述一个或多个色谱步骤之前进行。

[0313] 实施方案27.实施方案26所述的方法,其中所述超滤为切向流超滤。

[0314] 实施方案28.实施方案26或27所述的方法,其中所述超滤使用膜过滤器,所述膜过滤器包括具有至少10kDA分子量截留的孔径。

[0315] 实施方案29.实施方案26或27所述的方法,其中所述超滤使用膜过滤器,所述膜过滤器包括具有至少30kDA分子量截留的孔径。

[0316] 实施方案30.实施方案26或27所述的方法,其中所述超滤使用膜过滤器,所述膜过滤器包括具有至少50kDA分子量截留的孔径。

[0317] 实施方案31.实施方案26或27所述的方法,其中至少75%的所述重组ASA保留在上述不纯制品中。

[0318] 实施方案32.实施方案26或27所述的方法,其中至少75%的所述重组ASA渗透过所述过滤器。

[0319] 实施方案33.实施方案26或27所述的方法,其中所述超滤包括聚醚砜或纤维素膜。

[0320] 实施方案34.实施方案26-33中任一项所述的方法,其中所述超滤之后为深度过滤和/或病毒灭活的一个或多个步骤。

[0321] 实施方案35.实施方案34所述的方法,其中所述深度过滤和/或病毒灭活的一个或多个步骤之后为一个或多个色谱步骤。

[0322] 实施方案36.实施方案34或35所述的方法,其中所述病毒灭活的步骤包括将去污剂加入不纯制品。

[0323] 实施方案37.前述实施方案中任一项所述的方法,其中通过在悬浮液中培养的哺乳动物细胞来制备所述重组ASA蛋白。

[0324] 实施方案38.实施方案37所述的方法,其中将所述哺乳动物细胞在生物反应器中培养。

[0325] 实施方案39.实施方案37或38所述的方法,其中培养基无血清。

[0326] 实施方案40.实施方案39所述的方法,其中无血清培养基为化学成分确定的培养基。

[0327] 实施方案41.实施方案37-40中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物细胞为人细

胞。

[0328] 实施方案42. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述不纯制品为来自灌注生物反应器的进料流。

[0329] 实施方案43. 实施方案1-41中任一项所述的方法, 其中所述不纯制品由无血清培养基制备, 所述无血清培养基含有由哺乳动物细胞分泌的重组ASA蛋白。

[0330] 实施方案44. 实施方案43所述的方法, 其中所述不纯制品从冷冻的培养基制品中解冻。

[0331] 实施方案45. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述超滤和/或渗滤的步骤包括将经纯化的重组ASA蛋白交换进入药物配制缓冲液。

[0332] 实施方案46. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1 (对应于野生型人ASA蛋白) 至少70%同一的氨基酸序列。

[0333] 实施方案47. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述重组ASA蛋白具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。

[0334] 实施方案48. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于100ng/mg HCP。

[0335] 实施方案49. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于60ng/mg HCP。

[0336] 实施方案50. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中当使用考马斯亮蓝染色法进行SDS-PAGE时, 所述经纯化的重组ASA蛋白没有大于1.0%测定法对照强度的新谱带。

[0337] 实施方案51. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于100pg/mg宿主细胞DNA。

[0338] 实施方案52. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述经纯化的重组ASA蛋白含有小于50pg/mg宿主细胞DNA。

[0339] 实施方案53. 一种纯化重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白的方法, 所述方法包括

[0340] 通过进行一个或多个色谱步骤由不纯制品中纯化重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白, 其中第一色谱步骤使用具有约4.5g蛋白/L树脂或大于约4.5g蛋白/L树脂的装载容量的柱;

[0341] 合并来自所述一个或多个色谱步骤的洗脱液;

[0342] 调节所述合并的洗脱液的pH到约6.0或大于约6.0的pH; 和

[0343] 使所述经调节pH的洗脱液进行超滤和/或渗滤。

[0344] 实施方案54. 实施方案53所述的方法, 其中所述进行一个或多个色谱步骤包括以如下顺序进行: 阴离子交换色谱、混合模式色谱、疏水相互作用色谱和阳离子交换色谱。

[0345] 实施方案55. 实施方案54所述的方法, 其中所述阴离子交换色谱使用具有TMAE树脂的柱。

[0346] 实施方案56. 实施方案55所述的方法, 其中所述TMAE柱具有约5-20g蛋白/L树脂的装载容量。

[0347] 实施方案57. 实施方案53-56中任一项所述的方法, 其中超滤和/或渗滤的单一步骤在所述一个或多个色谱步骤之后进行。

[0348] 实施方案58. 一种根据前述实施方案中任一项所述方法纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 蛋白。

- [0349] 实施方案59.一种药物组合物,包含实施方案58所述的重组ASA蛋白。
- [0350] 实施方案60.一种治疗异染性脑白质营养不良疾病的方法,包括向需要治疗的受试者施用实施方案59所述的药物组合物。
- [0351] 实施方案61.一种包含经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 的组合物,所述经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 具有与SEQ ID NO:1至少70%同一的氨基酸序列,
- [0352] 其中所述经纯化的重组ASA具有至少约50U/mg的比活性;并且
- [0353] 进一步地,其中所述经纯化的重组ASA含有小于150ng/mg宿主细胞蛋白 (HCP) 和/或150pg/mg宿主细胞DNA (HCD)。
- [0354] 实施方案62.实施方案61所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA含有小于100ng/mg HCP。
- [0355] 实施方案63.实施方案61或62所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA含有小于60ng/mg HCP。
- [0356] 实施方案64.实施方案61-63中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA含有小于100pg/mg HCD。
- [0357] 实施方案65.实施方案61-64中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA含有小于50pg/mg HCD。
- [0358] 实施方案66.实施方案61-65中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有至少约70U/mg的比活性。
- [0359] 实施方案67.实施方案61-66中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有至少约100U/mg的比活性。
- [0360] 实施方案68.实施方案61-67中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有至少约120U/mg的比活性。
- [0361] 实施方案69.实施方案61-68中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有范围为约50-200U/mg的比活性。
- [0362] 实施方案70.实施方案61-69中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有范围为约50-140U/mg的比活性。
- [0363] 实施方案71.一种包含经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 的组合物,所述经纯化的重组芳基硫酸酯酶A (ASA) 具有与SEQ ID NO:1至少70%同一的氨基酸序列
- [0364] 其中所述经纯化的ASA的特征在于包括七个或更少峰值基团的聚糖图谱,所述峰值基团选自指示中性(峰值基团1)、一唾液酸化(峰值基团2)、封端的甘露糖-6-磷酸化(峰值基团3)、二唾液酸化(峰值基团4)、一甘露糖-6-磷酸化(峰值基团5)、杂化(峰值基团6)和二甘露糖-6-磷酸化(峰值基团7)的峰值基团。
- [0365] 实施方案72.实施方案71所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有与SEQ ID NO:1至少80%同一的氨基酸序列。
- [0366] 实施方案73.实施方案71或72所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有与SEQ ID NO:1至少90%同一的氨基酸序列。
- [0367] 实施方案74.实施方案71-73中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA具有与SEQ ID NO:1至少95%同一的氨基酸序列。
- [0368] 实施方案75.实施方案71-74中任一项所述的组合物,其中所述经纯化的重组ASA

具有与SEQ ID NO:1同一的氨基酸序列。

[0369] 实施方案76.一种制剂,包含实施方案71-75中任一项所述的组合物和生理上可接受的载体。

[0370] 实施方案77.实施方案76所述的制剂,其中所述制剂适合静脉内施用。

[0371] 实施方案78.实施方案76所述的制剂,其中所述制剂适合鞘内施用。

[0372] 实施方案79.实施方案76所述的制剂,其中所述制剂适合皮下施用。

实施例

[0373] 实施例1.切向流超滤-捕获

[0374] 该实施例证实:切向流超滤(也称为横向流过滤)可用于捕获直接来自生产生物反应器的重组ASA蛋白。

[0375] 具体而言,未经纯化的大块材料通过切向流超滤由生产灌注生物反应器中捕获。按照生产商的说明书在Sartorius Hydrosart® 30kD标准膜中进行切向流过滤。

[0376] 进行另外的实验,其中使用Sartorius HYDROSART® ECO膜进行切向流过滤,而同时保持相同组成和分子量截留。ECO膜使得该工艺可利用较低的横向流速。

[0377] 使用等高线分析器(contour profiler)函数来分析使用ECO和标准膜进行的12次偏差运行条件产生的渗透通量值(LMH)。该函数显示一次两个因子的响应等高线。在该研究中,将各膜的进料流速和跨膜压力("TMP")与渗透通量相比较。示例性结果显示在图3中。

[0378] 如由ECO比标准膜偏差运行的等高线图可见,在测试的给定参数范围下ECO膜显示远远更强的通量输出。在操作范围内在较低进料流速下ECO膜能够得到较高的通量率。

[0379] 更加具体而言,根据设计运行的数据分析,滴度ELISA回收率的范围为约92%至132%。宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值范围为约0.11-0.38。如在申请的其他处描述测定滴度ELISA回收率、宿主细胞蛋白(HCP)对数减少值(LRV)和活性恢复百分比。

[0380] 该实验结果证实在芳基硫酸酯酶AIII期纯化工艺中实施UFDF捕获步骤的可行性。根据并排UFDF偏差运行,ECO膜特别有效,因为它能够在操作范围内在较低进料流速下得到较高的通量率。使用ECO膜也进行设计实验以评估装载试验的操作参数、TMP、进料流速、起始浓度因素和处理温度对rhASA捕获过程的性能的潜在影响。宿主细胞蛋白(HCP)ELISA和活性步骤产率未受到ECO膜的操作参数的显著影响。

[0381] 实施例2.深度过滤和病毒灭活

[0382] 该实验示出在纯化工艺中可实施的用于深度过滤和病毒灭活的条件。

[0383] 例如,将捕获的未经纯化的大块材料在2-8℃下解冻 ≤ 120 小时。将大块材料的温度调节到约 $18 \pm 2^\circ\text{C}$,并过滤通过Cuno Zeta Plus深度过滤器,然后通过研磨过滤。将Sartorius Maxicap Sartopore 2, $0.45 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 研磨过滤膜盒(polishing filtration capsule)连接在深度过滤器的下游以在用于下游加工的制品中去除微粒和减少生物负载。使用注射用水("WFI")冲洗过滤器,然后为MES-Tris, pH 7.1平衡溶液。

[0384] 在过滤之后进行最后的漂洗以回收过滤组的滞留材料。一旦完成过滤,则使用0.05MES-Tris, pH 7.0漂洗溶液来冲洗过滤器组。将收集的漂洗液加入经过滤合并的大块材料中。

[0385] 随后通过加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯(TnBP)如下后续孵育3-24小时经病毒灭

活步骤来处理经过滤但未经纯化的大块。将聚山梨酯80由在0.05M MES-Tris,pH 7.1中10% (v/v) 储备溶液加入到经过滤合并的未经纯化的大块,从而得到1%的最终浓度。然后将磷酸三丁酯 (TnBP) 加至以含有聚山梨酯80的未经纯化的大块的新体积计的约0.3%的最终浓度。将所得合并物混合以相容,然后连续搅拌下孵育约3-24小时。

[0386] 当完成病毒灭活时,在装载到第一色谱柱之前,将合并物处理通过聚偏二氟乙烯 (PVDF) 0.2 μ m过滤器。在该实验中,在病毒灭活孵育起始时间的约28小时内将经过滤的病毒灭活合并物应用到Q柱(如下描述)。将病毒灭活中间体过滤,并且在过滤结束时,使用0.05M MES-Tris,pH 7.0缓冲液来冲洗过滤器以最大化产品回收。

[0387] 实施例3.阴离子交换色谱

[0388] 该实施例示出阴离子交换色谱的示例性条件,尤其,当将阴离子交换色谱用作第一色谱步骤时。在该特定实施例中,将Q SEPHAROSE™快速流柱 (Q FF) 树脂用在以结合和洗脱方式操作的季铵阴离子交换中。

[0389] 使用标准方法来制备Q FF柱。在7.0的pH下ASA与Q柱结合,然后在pH 7.1下使用0.02M MES-Tris,0.26M NaCl洗脱。在约100的流速下进行装载、洗涤和洗脱。操作温度范围为16-23℃。通过峰值上升侧处0.5AU/cm到峰值下降侧处0.25AU/cm的280nm (A280) 设定点的吸光度来采集Q洗脱液。用于阴离子交换柱的示例性条件显示在表2中。

[0390] 表2:用于阴离子交换柱的示例性条件

[0391]	溶液	用途
	0.5M NaOH	消毒
	0.02M MES-Tris,1M NaCl,pH 7.0	预平衡和洗提
	0.05M MES-Tris,pH 7.0	平衡和洗涤1
	0.02M MES-Tris,0.12M NaCl,pH 7.1	洗涤2
	0.02M MES-Tris,0.26M NaCl,pH 7.1	洗脱和使用后过滤器追踪
	0.5M NaOH,3M NaCl	清洁
	0.01M NaOH	储存

[0392] 进行另外的实验以比较示例性阴离子交换树脂的纯度、活性和处理量(例如靶装载容量)。尤其,为了便于按比例增加,在该研究中筛选和评估多种高容量阴离子交换树脂。

[0393] 一旦“填充”,则使用在表3中显示的条件平衡、装载、洗涤和洗脱树脂。在该研究中,结合条件与上述的Q FF工艺保持相同。使用A280吸光度、滴度测定法和SDS-PAGE (Coomassie和Silver染色)来采集和分析流过 (FT)、洗涤 (W) 和洗脱/洗提 (EL/洗提) 的部分。

[0394] 表3.示例性条件

[0395]	步骤	缓冲液或材料
	平衡	50mM MES-Tris,pH7.0
	装载	Atlas GMP-1H19/20UPB
	洗涤	50mM MES-Tris,pH7.0
	洗脱/洗提	50mM MES-Tris,1M NaCl,7.0

[0396] 评价除了Q FF之外的七种树脂以测定结合容量、选择性和回收。所有树脂的总产率相当,范围为80-83%,这表明回收相似以及实验操作一致。一些树脂具有比Q FF小的结

合容量,而其他树脂具有更高的结合容量。尤其,证实在所有测试的树脂中Fractogel结合容量最高,选择性最高以及回收相当。而且,在15g/L的装载下Fractogel流过时观察到非常少的产品损耗。

[0397] 显示Q FF和Fractogel树脂的产率和结合容量的示例性结果显示在表4中。

[0398] 表4:结合容量和产率的示例性结果

树脂	A280 产率				结合 (AU/L)
	FT	洗涤	洗脱/洗提	总和	
Q FF	37%	2%	42%	82%	62
Fractogel	17%	2%	62%	81%	83

[0400] 并排确认运行

[0401] 为了验证Fractogel工艺和评价它对后续纯化步骤和最终药用物质(“DS”)质量的影响,从未经纯化的大块材料直至药用物质(包括在本实施例中描述的色谱步骤)进行Fractogel TMAE比对Q FF的并排纯化工艺。在阴离子交换色谱之后另外的纯化步骤如下所述(以执行顺序呈现):HA柱混合模式色谱、苯基柱疏水相互作用色谱、SP柱阳离子交换色谱以及具有插入的病毒过滤步骤的超滤/渗滤两个步骤。

[0402] A280和滴度产率相当。柱之间的HCP减少也类似。

[0403] 而且,SDS-PAGE(银)凝胶(图4)显示在整个工艺中Fractogel和Q FF相似的谱带轮廓。CE-SDS数据显示在第一步时Fractogel比Q FF纯度更高,但在苯基柱步骤之后结果相当。通过HCP/rhASA比率证实这点。

[0404] 评估两个柱的SP洗脱液以及对照运行SP洗脱液的质量属性。Fractogel和Q FF工艺提供类似的纯度和可接受的SP洗脱液,但是由于在未经纯化的装载原材料上有差别,所以某些属性与对照有轻微的差别。

[0405] 总之,如通过以上结果所证实,使用Fractogel作为第一柱提供与使用Q FF作为对照工艺可比较的工艺性能(产率,HCP减少)和SP质量属性。然而,Fractogel柱提供更高的装载容量和增加的处理量。

[0406] 最后,并排确认运行显示:Fractogel TMAE工艺具有与Q FF工艺可比较的性能(产率、HCP去除),但是提供较高靶装载容量(例如,至少10g rhASA/L)的额外益处。未观察到在介于5-20g/L之间范围的特征化装载的显著产率损耗。Fractogel运行的SP洗脱液的质量属性也与对照Q FF运行相当。

[0407] 实施例4.混合式羟磷灰石(HA)色谱

[0408] 该实施例示出在重组ASA蛋白的纯化中可使用的混合式羟磷灰石色谱的示例性条件。

[0409] 具体而言,随后通过羟磷灰石(HA)色谱纯化如上制备的阴离子交换色谱洗脱液。制备可市售获得的陶瓷羟磷灰石1型树脂柱。在该实施例中,使用0.250M磷酸钠缓冲液,pH 7.0来预平衡柱。

[0410] 以结合和洗脱方式操作HA柱。首先将阴离子交换洗脱液加温到环境温度,然后在装载到HA柱之前调节到约0.001M磷酸钠。在pH7.0下rhASA结合柱,然后使用约0.04M磷酸钠,pH 7.1来洗脱柱。在约150cm/h的流速下进行装载、洗涤和洗脱。通过峰值上升侧处0.5AU/cm到峰值下降侧处0.25AU/cm的280nm(A280)设定点的吸光度来采集HA洗脱液。用于HA柱的示例性条件显示在表5中。

[0411] 表5:用于HA柱的示例性条件

	溶液	用途
	0.5M NaOH	消毒
	0.25M 磷酸钠, pH7.0	电荷和装载调节
	0.001M 磷酸钠, 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0	平衡和洗涤 1
[0413]	0.005M 磷酸钠, 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0	洗涤 2
	0.04M 磷酸钠, pH7.1	洗脱和使用后过滤器追踪
	0.4M 磷酸钠, pH 12	洗提
	0.5M NaOH	清洁
	0.1M NaOH	储存

[0414] 实施例5.疏水性相互作用(苯基)色谱

[0415] 该实施例示出在重组ASA蛋白的纯化中可使用的疏水性相互作用(苯基)色谱的示例性条件。

[0416] 具体而言,随后通过苯基柱色谱纯化如上制备的HA柱色谱洗脱液。填充和制备用于rhASA的纯化的可市售获得的苯基Sepharose快速流柱。

[0417] 以结合和洗脱方式操作苯基柱。在加温直到环境温度之后,然后在装载到苯基柱之前,将HA洗脱液调节到约1.1M NaCl以及使用无酸的0.5M MES调节pH到约5.6。在pH 5.6下rhASA结合柱,然后使用0.02M MES-Tris,0.06M NaCl,pH 7.1来洗脱柱。在约150cm/h的流速下进行装载、洗涤和洗脱。通过峰值上升侧处0.5AU/cm到峰值下降侧处0.25AU/cm的280nm(A280)设定点的吸光度来采集苯基洗脱液。用于苯基柱的示例性条件显示在表6中。

[0418] 表6:用于苯基柱的示例性条件

	溶液	用途
[0419]	0.5M NaOH	消毒和清洁
	0.05M 磷酸钠, 1M NaCl, pH 5.6	平衡和洗涤 1
	5M NaCl	装载调节
	0.5M MES, 无酸	装载调节
[0420]	0.02M MES, 0.05M 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH 5.6	洗涤 2
	0.02M MES-Tris, 0.06M NaCl, pH 7.1	洗脱和使用后过滤器追踪
	WFI	洗提
	0.01M NaOH	储存

[0421] 实施例6.阳离子交换色谱

[0422] 该实施例示出在重组ASA蛋白的纯化中可使用的阳离子交换色谱的示例性条件。

[0423] 具体而言,随后通过阳离子交换色谱纯化如上制备的苯基柱色谱洗脱液。在该实施例中,填充和制备SP-650M柱(TOYOPEARL)。

[0424] 以结合和洗脱方式操作SP柱。将苯基柱洗脱液加温到16-23℃,然后使用WFI稀释

以降低传导性,并在装载到SP柱之前使用约1M乙酸调节到pH 4.2。在pH 4.2下rhASA结合柱,然后使用0.01M醋酸钠,0.01M乙酸,0.05M NaCl,pH 4.5来洗脱柱。在约150cm/h的流速下进行装载、洗涤和洗脱。通过峰值上升侧处0.25AU/cm到峰值下降侧处0.25AU/cm的280nm (A280) 设定点的吸光度来采集SP洗脱液。用于SP柱的示例性条件显示在表7中。

[0425] 表7:SP柱的示例性条件

[0426]	溶液	用途
	0.5 M NaOH	消毒和清洁
[0427]	0.013 M醋酸钠, 0.007 M乙酸, 1M NaCl, pH 4.5	预平衡和洗提
	0.01 M醋酸钠, 0.01 M NaCl, 0.03 M乙酸, pH 4.2	平衡和洗涤
	0.01 M醋酸钠, 0.01 M乙酸, 0.05 M NaCl, pH 4.5	洗脱和使用后过滤器追踪
	1M乙酸	装载调节
	WFI	装载调节
	0.01 M NaOH	储存

[0428] 实施例7.超滤/渗滤和病毒过滤

[0429] 该实施例示出在重组ASA蛋白的纯化中可使用的超滤/渗滤和病毒过滤的示例性条件。

[0430] 超滤/渗滤1

[0431] 将SP洗脱合并物浓缩和使用10kDa Hydrosart Sartocoon膜来渗滤。将产品合并物浓缩到大约15mg/mL和使用6-8体积的0.01M磷酸钠-柠檬酸盐,0.137M NaCl,pH 6.0来渗滤。然后将浓缩和渗滤的产品合并物处理通过0.2 μ m过滤器。

[0432] 将浓缩/渗滤的合并物经0.2 μ m过滤,并通常保存在2-8℃下小于约24小时。

[0433] 病毒过滤

[0434] 在超滤/渗滤1之后可以进行病毒过滤操作以去除工艺物料流中任何病毒样粒子。例如,设置具有泵、Planova过滤器和压力计的过滤组。在11.01b/in²的目标压力下,使用1L的0.154M NaCl冲洗过滤器通过保留侧,然后使用大于3L冲洗通过渗透侧。一旦完成,则使用4L的0.154M NaCl来冲洗过滤器以增加产品回收。使用之后在过滤器上进行金粒子测试以确保维持过滤器完整性。

[0435] 超滤/渗滤2

[0436] 将过滤病毒的材料浓缩到15-30mg/ml,然后使用10kDa Hydrosart Sartocoon UFDF膜经6-8体积的0.154M NaCl渗滤缓冲液来渗滤。一旦完成渗滤,则将材料进一步浓缩到48-50mg/ml。然后使用渗滤缓冲液冲洗系统。然后将适量的系统漂洗液加回到产品浓缩物以得到大约40mg/ml的目标最终浓度。

[0437] 实施例8.单一超滤/渗滤单元操作

[0438] 在实施例7中描述的工艺包括SP柱洗脱液的超滤/渗滤(“UFDF”) (UFDF1)、UFDF1浓缩物的病毒过滤和病毒滤液的最后UFDF (UFDF2) 以产生预最终药用物质 (DS)。这些工艺的

示例性流程图显示在图1中。

[0439] 在该实施例中,进行另外的实验以确定去除一个UFDF单元操作来减少总工艺时间、费用和潜在增加工艺产率的可行性。因此,进行研究以评价经调节pH的SP洗脱液进行病毒过滤、之后为一次单一的UFDF单元操作以生成预最终经过滤的药用物质(“DS”)的可行性。

[0440] 本研究利用经部分纯化的来源材料,该来源材料之前已经通过如上所述的SP洗脱液由未经纯化的大块材料(“UPB”)纯化。SP洗脱液用作在本研究中进行的三次UFDF运行的装载物,该三次UFDF运行包括两次可行性实验运行和如上所述的双UFDF工艺的一次对照运行。两次实验(也称为可行性)运行由在SP洗脱液合并物的pH调节之后的一次UFDF和一次超滤/两次渗滤(“UFDFDF”)组成。将用于可行性运行的SP洗脱液调节pH到6.0,然后通过例如Planova20N病毒过滤器来过滤病毒。将实验运行与如上所述的UFDF1-病毒过滤-UFDF2的对照运行比较。

[0441] 将SP洗脱液调节到pH 6.0,过滤病毒和分配为两个相等体积;每一实验可行性运行利用两病毒滤液合并物之一。如在表8中所示设计示例性SP洗脱合并物pH调节缓冲液配制。测定约0.075L调节缓冲液/L的SP洗脱液的体积/体积加入方法以得到约6.0的目标pH。

[0442] 表8:示例性pH调节缓冲液

[0443]

化学组分	浓度 (g/L)	浓度 (mM)
磷酸二氢钠	4	30
磷酸氢二钠	58	220
二水合柠檬酸钠	10	34
氯化钠	77	1330

[0444] 一旦接收实验运行的SP合并洗脱液,则进行pH调节到6.0;该调节产生具有pH 5.98的SP洗脱液。然后将经pH调节的SP洗脱液在Planova 20N过滤器上过滤病毒。

[0445] 表9包括单独单元操作步骤产率的小结。如所观察到的,所有UFDF运行表现出基于A280的类似的回收产率。实验性病毒过滤单元操作产生106.6%的步骤产率,这表明在过滤时没有损耗A280吸收蛋白。病毒过滤产率很重要,因为它证实pH调节到约6.0使得20nm直径rhASA八聚合体分子可分解为二聚型。据认为,在酸性条件(pH5.0)下,rhASA分子作为八聚合体存在;而在中性pH下,它分解为二聚型。因为Planova 20N具有20nm的孔径,所以rhASA蛋白分子构象不是八聚合体型很重要,因为八聚合体rhASA很可能保留/损耗在病毒过滤器内。步骤产率数据证实了通过调节SP洗脱液的pH在UFDF操作之前进行病毒过滤的可行性。这些产率数据表明:在病毒过滤时rhASA没有损耗,并且对纯化效率和定向药用物质配制pH来说,pH调节均很重要。

[0446] 表9:步骤产率小结

[0447]

运行	步骤产率
可行性病毒过滤	106.6%
实验运行 1 - UFDFDF	97.5%
实验运行 2 - UFDF	99.6%

[0448]

对照 UFDF1	99.3%
对照 UFDF2	98.0%

[0449] 一旦完成病毒过滤,则将病毒滤液合并物均匀地分成两个部分。将一部分供给实验运行1(UFDFDF),而另一部分供给实验运行2(UFDF)。

[0450] 如下所证实,在UF和开始的DF段,两实验运行得到类似的平均渗透率。此外,实验1的第二DF段表现出与UF和开始的DF段类似的平均渗透率。与可行性运行相比,对照运行UFDF1和UFDF2均一致地得到较低的平均渗透率值,这可能是通过在所利用的装置规模内的可变性导致。

[0451] 表10:平均渗透率和总处理时间

运行	UF 平均渗透率 (LMH/psi)	DF1 平均渗透率 (LMH/psi)	DF2 平均渗透率 (LMH/psi)	总处理时间 (min)
实验 1; UFDFDF	2.5	2.4	2.3	86
实验 2; UFDF	2.5	2.6	N/A	60
对照 UFDF1	1.6	1.5	N/A	58
对照 UFDF2	1.6	1.3	N/A	48

[0453] 通过包括以下的一系列分析测定法来比较对照运行和实验运行的药用物质的产品质量:SEC-HPLC、RP-HPLC、活性、SDS-PAGE/HCP Western、SDS-PAGE (Coomassie)、聚糖图谱、肽图谱和金属分析。

[0454] SEC-HPCL&RP-HPLC

[0455] 表11提供尺寸排阻(SEC-HPLC)和反相(RP-HPLC)结果。SEC和RP数据指示在实验运行和对照运行药用物质之间可忽略不计的差别,这表明两次实验运行产生的药用物质具有与对照运行的药用物质可比较的SEC和RP主峰百分比。这些数据证实利用任一实验运行替代双UFDF对照工艺的可行性,因为未鉴定到纯度的可辨别差异。

[0456] 表11:SEC-HPLC&RP-HPLC结果

DS批	SEC主峰%	RP主峰%
实验1;UFDFDF	98	99
实验2;UFDF	98	99
对照	98	99

[0458] 活性

[0459] 表12详述活性(U/mL)和比活性(U/mg);将吸光度(AU)除以0.67的已知吸光系数来测定浓度(mg/mL)。尽管观察到实验运行1(UFDFDF)得到较低的比活性值,但是它完全也在50-140U/mg说明书期望范围内。实验运行2(UFDF)得到与对照运行可比较的比活性。所有三次运行(两次实验和一次对照)均可比较,这表明用于获得配制的药用物质的方法不影响药用物质活性。

[0460] 表12:活性和比活性结果

DS 批	活性 (U/mL)	浓度 (mg/mL)	比活性 (U/mg)
可行性 1; UFDFDF	2683	38.7	69.3
可行性 2; UFDF	3320	39.5	84.1
对照	3658	40.4	90.5

[0462] 宿主细胞蛋白(HCP)Western&SDS-PAGE(Coomassie)

[0463] 图5和6分别示出SDS-PAGE/HCP蛋白质印迹法和SDS-PAGE (Coomassie) 凝胶显像。如在图5中观察到,实验(可行性)和对照运行样品(泳道5、7、9)表现出与参比标准品(泳道3)类似的谱带图案,这表明来自所有运行的药用物质均表现出可相比较的较低水平的HCP。图6也证实实验(可行性)和对照运行与参比标准品之间的可比性;通过SDS-PAGE (Coomassie) 未检测到另外的谱带图案。这些数据表明:基于SDS-PAGE/HCP蛋白质印迹法和SDS-PAGE (Coomassie) 分析,来自实验运行条件的药用物质的产品质量与对照运行的药用物质的产品质量是可相比较的。在HCP蛋白质印迹法中未观察到大于对照的15kDa HCP谱带强度的HCP谱带;并且未观察到大于1%测定法对照强度的新谱带。

[0464] 聚糖图谱

[0465] 表13示出示例性聚糖图谱。发现在所有测试的样品中所有糖基化形式以类似的水平出现。结果表明实验(可行性)运行的药用物质的产品质量与对照运行的药用物质可比较。

[0466] 表13:聚糖图谱结果

[0467]	形式	峰值基团
	中性	1
	1-SA	2
	封端的M6P	3
[0468]	2-SA	4
	1-M6P	5
	杂化	6
	2-M6P	7

[0469] 金属分析和pH

[0470] 还对实验和对照产生的药用物质(DS)进行金属分析以测定残余磷酸盐水平。表14示出各药物样品的残余磷和最终pH。发现在所有运行条件下残余磷可比较。还发现,无论什么运行条件,pH均类似。如果假设残余磷酸盐有助于维持药用物质pH,残余磷的结果也与所有三批药用物质的pH得到维持的观察一致。这些数据表明两实验(可行性)运行均得到在药用物质中与对照运行类似的残余磷酸盐水平,而且所有三批药用物质均能够维持在最终制剂中约6.0(即,5.5-6.5)的目标pH。

[0471] 如表14所示,金属分析也检测到盖水平升高。在所有样品中钙水平相当一致。之前的研究已经显示钙离子存在于rhASA的活性位点,这对于酶活性很重要。

[0472] 表14:残余磷、钙和pH结果

[0473] DS批	磷(ppm)	钙(ppm)	pH
可行性1;UFDFDF	29	11	6.2
可行性2;UFDF	31	10	6.1
对照	33	11	6.2

[0474] 肽图谱

[0475] 进行肽图谱分析。再者,所有样品得到类似的轮廓,这表明测试的运行条件得到与对照可比较的rhASA肽图。

[0476] 结论

[0477] 以上实验评估通过调节SP洗脱液的pH在UFDF操作之前病毒过滤的可行性、单一UFDF步骤替代两个UFDF步骤的可行性和在病毒过滤步骤之后单一渗滤(比对双过滤)的可行性。

[0478] 在实验可行性运行中病毒过滤单元操作的高步骤产率证实UFDF操作之前病毒过滤的可行性。因为病毒滤液使得rhASA分子可传递到滤液,所以进行两次UFDF可行性运行。因为所有产品质量和工艺性能度量表明两次可行性运行与对照可比较,所以已经确定单一UFDF步骤是可行的。结果也证实对最终配制溶液(0.9%盐水溶液)(实验可行性运行2)直接单一渗滤的可行性,因为该工艺能够产生与通过对照和双渗滤实验(实验可行性运行1)产生的药用物质质量可比较的药用物质。

[0479] 基于这些数据,已经确定,将pH调节到约6.0、利用例如在表4中包含的缓冲液制剂将产生在最终UFDF操作之间适于病毒过滤的经调节pH的SP洗脱液。在图2中示例的该工艺已经显示可替代包括UFDF步骤、之后为病毒过滤、然后为另一UFDF步骤的工艺。已经证实pH-调节-病毒过滤-UFDF工艺产生与通过更加复杂、昂贵和耗时工艺产生的药用物质质量和纯度可比较的药用物质。

[0480] 实施例9. 重组人芳基硫酸酯酶A(rhASA)药用物质

[0481] 将根据上述工艺纯化的rhASA配制为在154mM NaCl缓冲液中35-45mg/ml,其pH为约5.5-6.5。

[0482] 最终药用物质的肽和聚糖图谱与在实施例8中描述的那些一致。如通过THRESHOLD®DNA测定法测定,残余宿主细胞DNA以 $\leq 100\text{pg/mg}$ 的量存在。通过反相和尺寸排阻HPLC测定的纯度分别指示大于98%和大于95%主峰面积。蛋白质印迹法表明没有强度大于在测定法对照中大约15kDa HCP谱带强度的宿主细胞蛋白(HCP)谱带。仅检测到三个HCP谱带。SDS-PAGE(Coomassie;还原性)分析与参比标准品一致,其没有强度大于1%测定法对照的新谱带。测定的比活性为50-140U/mg。

[0483] 等同形式和范围

[0484] 本领域技术人员仅使用常规实验会意识到或者能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同形式。不期望本发明的范围受到以上描述的限制,而是如以下权利要求书中所示。

[0485] 在权利要求书中修饰权利要求要素的顺序术语(例如“第一”、“第二”、“第三”等)的使用本身并不意味着任何优先性、优越性或一个权利要求要素的顺序在另一个要素之上或者进行方法行为的时间顺序,而仅用作将具有某名称的一个权利要求要素与具有相同名称(但使用顺序术语)的另一要素区分的标签,从而区分权利要求要素。

[0486] 除非明确相反说明,在说明书和权利要求书中如本文所使用的冠词“a”和“an”应当理解包括复数指示物。除非文本中相反或另有明确说明,应认为在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述满足一个、多于一个或所有组成员存在、被采用或者与给定产品或方法相关。本发明包括组的仅一个成员存在、被采用或者与给定产品或方法相关的实施方案。本发明也包括多于一个或全部组成员存在、被采用或者与给定产品或方法相关的实施方案。而且,理解,除非另有说明或者除非对本领域普通技术人员明显会引起矛盾或不一致,本发明涵盖一个或多个所示权利要求的一种或多种限制因素、要素、成句、描述

性定语等引入到从属于相同基础权利要求的另一权利要求(或者如相关的任何其他权利要求)的所有变化、组合和排列。在元素作为列表表示时(例如,在马库什基团中或类似格式),理解它也公开了元素的各亚族,并且可由基团中去除任何元素。通常,应当理解,在提及本发明或本发明的多个方面包括特定要素、特征等的情况下,本发明或本发明的多个方面的某些实施方案由或者基本由这些要素、特征等组成。为了简便起见,那些实施方案不会在每一种情况下都用本文中如此多辞藻具体阐述。应当理解,本发明的任何实施方案或方面可由权利要求中明确排除,无论该具体排除是否在说明书中叙述。本文所引用的描述本发明的背景和提供关于它实施的另外详细的细节的出版物、网站或其他参考材料均通过引用在此并入本文。

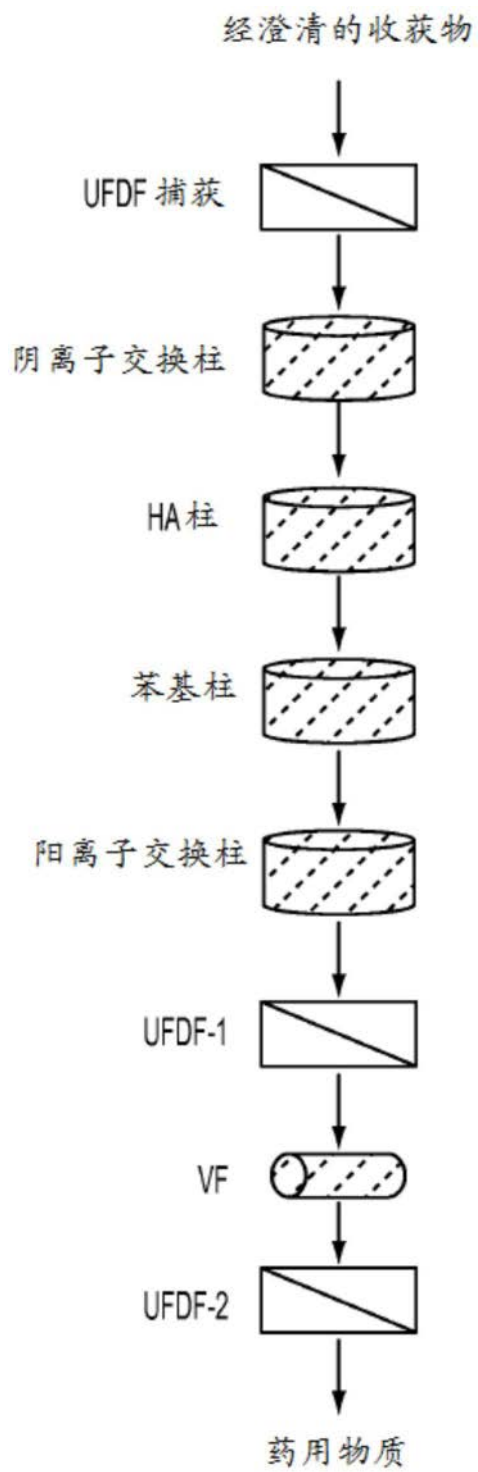


图1

经澄清的收获物

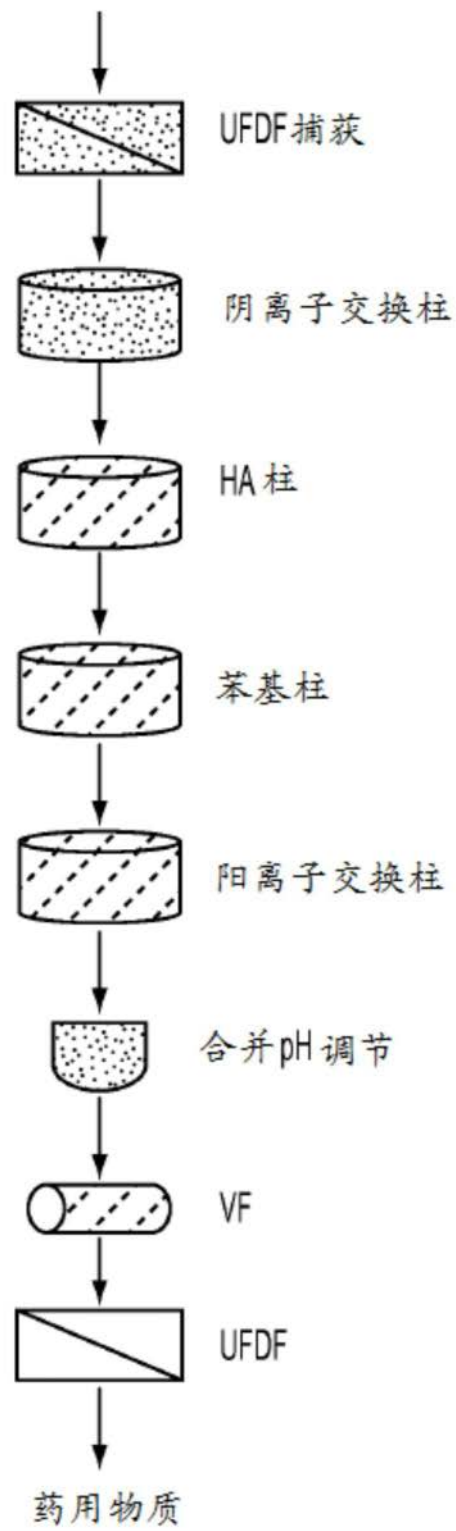


图2

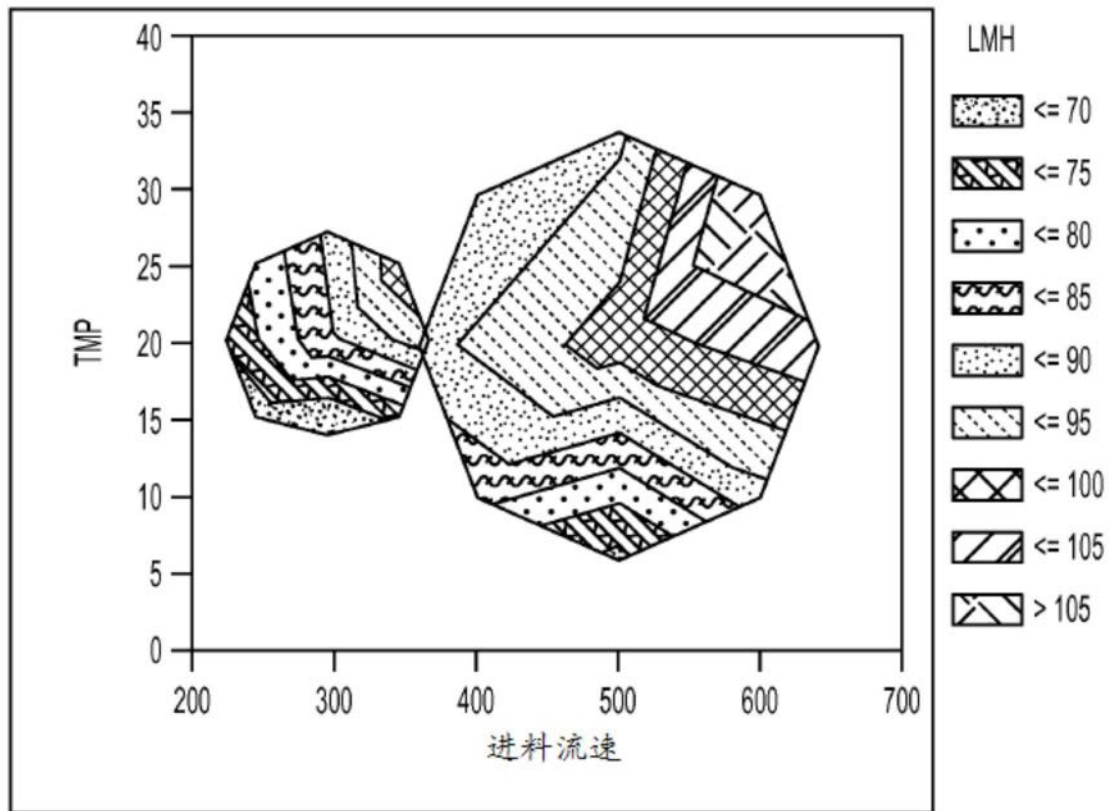


图3

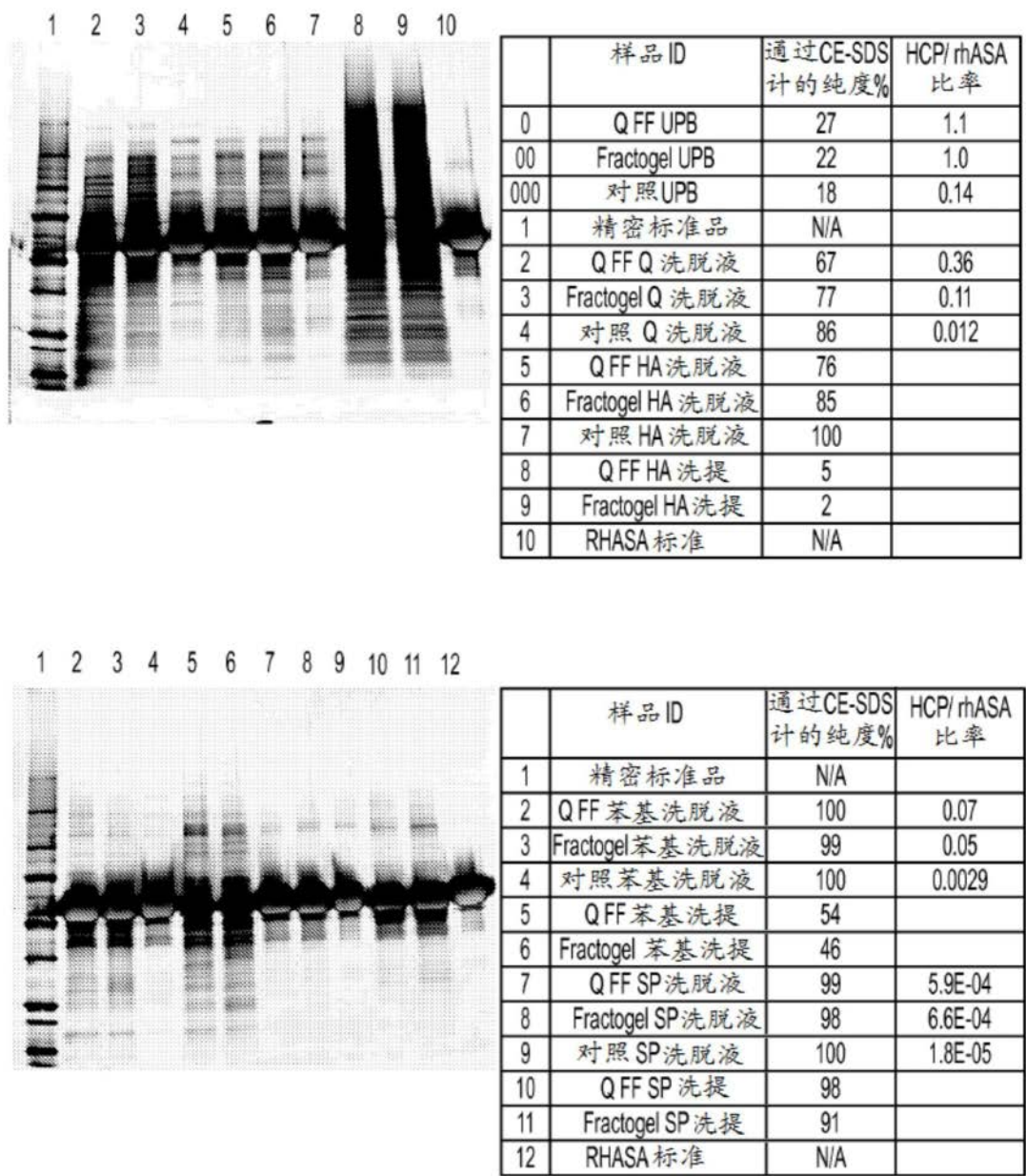


图4

泳道	装载样品	PAD ID	装载的 体积 (μ l)	总 μ g
1	Precision Proteins 标准(全蓝)		5	
2	HCP 对照 2		20	76 ng HCP
3	ARSA 参比标准, 批号JP11-001 (1X)		20	40
4	1X 缓冲剂空白			
5	RDAC11-172B DS 可行性1	12AD0142-1	20	40
6	1X 缓冲剂空白			
7	RDAC11-172B DS 可行性2	12AD0142-2	20	40
8	1X 缓冲剂空白		20	
9	RDAC11-172B DS 对照	12AD0142-3	20	40
10	1X 缓冲剂空白		20	

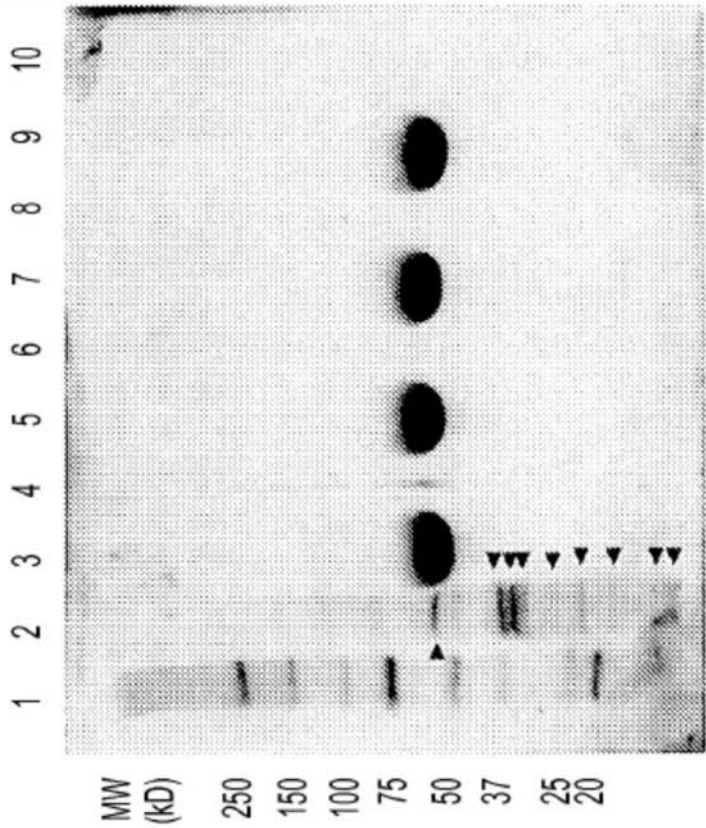


图5

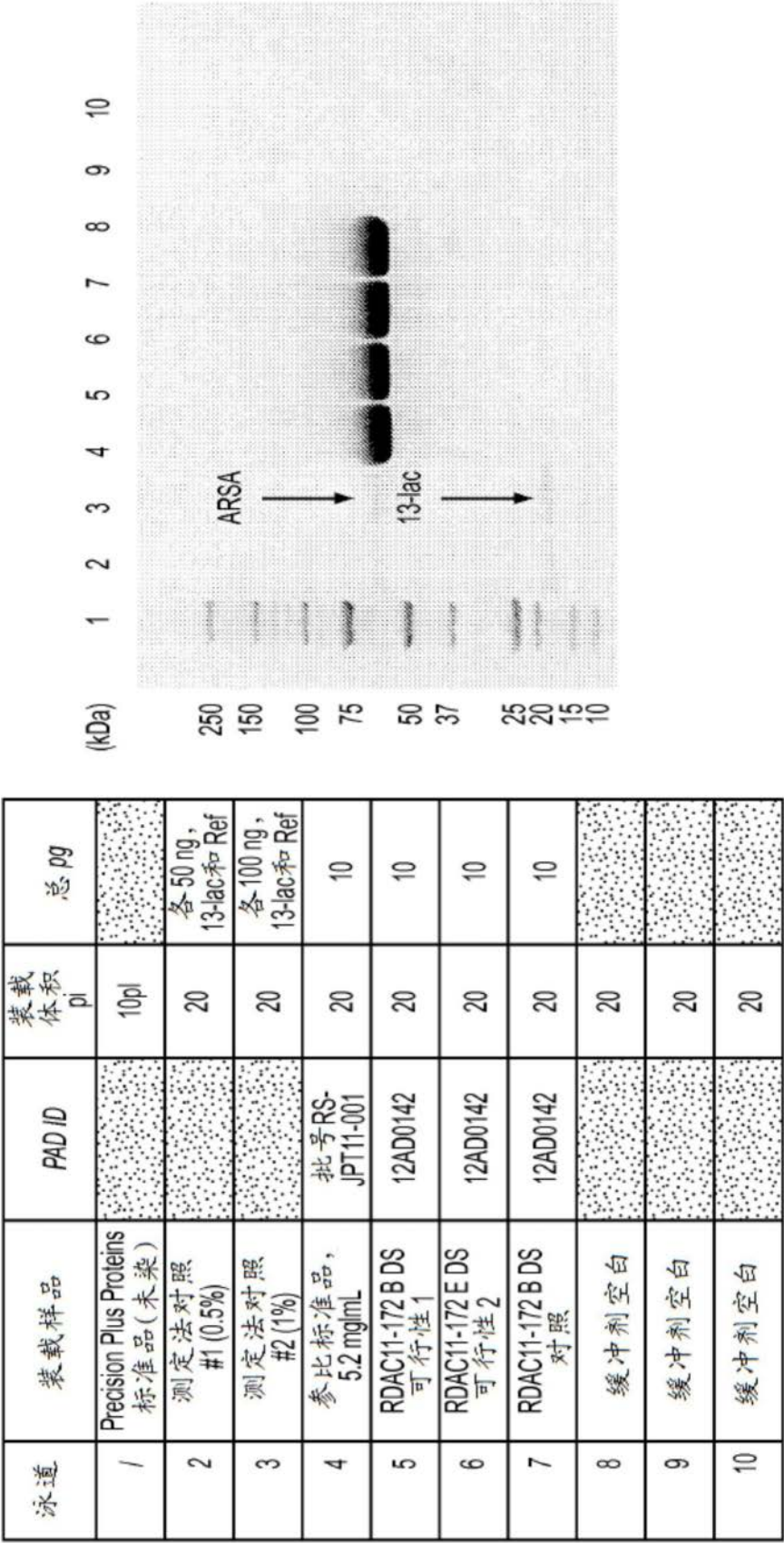


图6