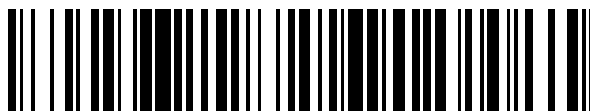


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 261**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2014** **PCT/US2014/010856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014** **WO14110246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014** **E 14701454 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2943568**

54 Título: **Métodos para la purificación se arilsulfatasa A**

30 Prioridad:

09.01.2013 US 201361750693 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2020

73 Titular/es:

SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.

(100.0%)

300 Shire Way

Lexington MA 02421, US

72 Inventor/es:

NICHOLS, DAVE;

QUINONES-GARCIA, IGOR;

CHEANG, BEE LIN y

JANG, MEI HUEI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 768 261 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la purificación de arilsulfatasa A

5 ANTECEDENTES

La enfermedad de leucodistrofia metacromática (MLD) es un trastorno recesivo autosómico resultante de una deficiencia de la enzima arilsulfatasa A (ASA). La ASA, que está codificada por el gen ARSA en humanos, es una enzima que descompone el 3-sulfato de cerebrósido o la 3-O-sulfogalactosilceramida de esfingolípido (sulfatida) en cerebrósido y sulfato. En ausencia de la enzima, las sulfatidas se acumulan en el sistema nervioso (por ejemplo, fundas de mielina, neuronas y células gliales) y en menor medida en los órganos viscerales. La consecuencia de estos eventos moleculares y celulares es la desmielinización progresiva y la pérdida axonal dentro del SNC y el SNP, que está acompañada clínicamente de disfunción motora y cognitiva grave.

Una característica clínica definitoria de este trastorno es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), que da como resultado una disfunción cognitiva (por ejemplo, retraso mental, trastornos nerviosos y ceguera, entre otros).

La MLD puede manifestarse en niños pequeños (forma infantil tardía), donde los niños afectados típicamente comienzan a mostrar síntomas justo después del primer año de vida (por ejemplo, aproximadamente a los 15-24 meses), y generalmente no sobreviven después de los 5 años.. La MLD puede manifestarse en niños (forma juvenil), donde los niños afectados generalmente muestran deterioro cognitivo aproximadamente a la edad de 3 a 10 años, y la esperanza de vida puede variar (por ejemplo, en el intervalo de 10-15 años después de la aparición de los síntomas). La MLD puede manifestarse en adultos (forma de aparición en adultos) y puede aparecer en individuos de cualquier edad (por ejemplo, típicamente a los 16 años o más tarde) y la progresión de la enfermedad puede variar mucho.

La terapia de reemplazo de enzimas (ERT) es una terapia aprobada para el tratamiento de la MLD, que implica administrar la enzima ASA de reemplazo exógeno, particularmente la arilsulfatasa A recombinante (rASA) (por ejemplo, la arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA)) a pacientes con MLD. La WO 2005/073367 A1, la WO 02/098455 A2 y la EP 0456229 A2 divulgan procesos para producir rASA, incluyendo pasos de purificación.

SUMARIO

En la presente se divulga un método mejorado para purificar la proteína ASA producida recombinantemente para la terapia de reemplazo enzimático. La presente divulgación se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la proteína ASA recombinante puede purificarse a partir de materiales biológicos no procesados, como medio de cultivo celular que contiene ASA, usando un proceso que implica solamente un único paso de ultrafiltración/diafiltración post-cromatográfica, que da como resultado una sustancia farmacéutica farmacéuticamente aceptable directamente en un tampón de formulación final. Como se describe en los Ejemplos a continuación, este proceso de UF/DF de un único paso se logra simplemente agrupando el eluato de los pasos de cromatografía y ajustando el pH del eluato agrupado a aproximadamente 6,0. Antes de la presente invención, Los procesos para purificar la proteína rASA producida recombinantemente implicaban por lo menos dos pasos de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) post-cromatográfica. Como se describe en la sección de Ejemplos, la proteína ASA recombinante purificada usando un proceso de UF/DF de un único paso de acuerdo con la invención tiene una pureza, actividad y rendimiento comparables en comparación con las proteínas ASA recombinantes purificadas usando múltiples pasos de UF/DF. Por ejemplo, la enzima ASA recombinante purificada de acuerdo con la presente invención no tiene más de 100 pg/mg de ADN de célula huésped, retiene una actividad específica alta (por ejemplo, aproximadamente 50-140 U/mg) y otras características distintas que pueden facilitar la biodisponibilidad y/o el direccionamiento lisosómico de la proteína ASA recombinante. Por lo tanto, este proceso simplificado es más rápido, más barato e igualmente eficaz para purificar la proteína ASA recombinante. Este proceso es particularmente útil cuando se combina con pasos de cromatografía de alta capacidad de carga para facilitar la producción a gran escala de proteína ASA recombinante.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para purificar la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante, el método comprendiendo la purificación de la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante a partir de una preparación impura mediante la realización de uno o más pasos de cromatografía; agrupar el eluato de uno o más pasos de cromatografía; ajustar el pH del eluato agrupado a un pH de 5.8-7.0; y someter el eluato con pH ajustado después de uno o más pasos de cromatografía a un único paso de (i) ultrafiltración, (ii) diafiltración o (iii) ultrafiltración/diafiltración combinadas, intercambiando de este modo la proteína ASA recombinante directamente en el tampón de formulación final.

En algunas realizaciones, el pH se ajusta usando un tampón que comprende fosfato de sodio, cloruro de sodio y citrato de sodio con pH 7,0. En algunas realizaciones, el tampón comprende aproximadamente 0,1-0,5 M (por ejemplo, aproximadamente 0,1-0,4 M, 0,1-0,3 M, 0,2-0,4 M, o 0,2-0,3 M) de fosfato de sodio, aproximadamente 0,5-2,5 M (por ejemplo, aproximadamente 0,5-2,0 M, 0,5-1,5 M, 0,75-2,5 M, 0,75-2,0 M, 0,75-1,5 M, 1,0-2,5 M, 1,0-

2,0 M, o 1,0-1,5 M) de cloruro de sodio y aproximadamente 0,1-0,6 M (por ejemplo, aproximadamente 0,1-0,5 M, 0,1-0,4 M, 0,2-0,5 M, 0,2-0,4 M, 0,3-0,5 M, o 0,3-0,4 M) de citrato de sodio con un pH de aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5. En algunas realizaciones, el tampón comprende aproximadamente 0,25 M de fosfato de sodio, aproximadamente 1,33 M de cloruro de sodio y aproximadamente 0,34 M de citrato de sodio con un pH de aproximadamente 7,0.

En algunas realizaciones, se realiza una filtración viral antes del paso de ultrafiltración y diafiltración. En algunas realizaciones, el único paso de ultrafiltración y/o diafiltración comprende solo una diafiltración. En diversas realizaciones, la ultrafiltración es ultrafiltración de flujo tangencial.

En algunas realizaciones, el uno o más pasos de cromatografía comprenden una cromatografía de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio catiónico es el último paso de cromatografía y el eluato de la cromatografía de intercambio catiónico se agrupa antes de ajustar el pH. En algunas realizaciones, se realizan una o más de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto y cromatografía de interacción hidrófoba antes de realizar la cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, el uno o más pasos de cromatografía comprenden una cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, la cromatografía de afinidad es el primer paso de cromatografía. En algunas realizaciones, la cromatografía de afinidad es el último paso de cromatografía y el eluato de la cromatografía de afinidad se agrupa antes de ajustar el pH. En algunas realizaciones, se realizan una o más de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto y cromatografía de interacción hidrófoba antes de realizar la cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, se realizan una o más de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto y cromatografía de interacción hidrófoba después de realizar la cromatografía de afinidad.

En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico es la cromatografía Q. En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico comprende una resina TMAE (por ejemplo, FRACTOGEL® TMAE). En algunas realizaciones, la resina TMAE, una vez cargada con la preparación impura, se lava con un primer tampón de lavado que comprende MES-Tris con un pH de aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones, el primer tampón de lavado comprende aproximadamente 20-75 mM de MES-Tris (por ejemplo, aproximadamente 30-60 mM, 40-70 mM o 40-60 mM). En ciertas realizaciones, el primer tampón de lavado comprende aproximadamente 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM o 75 mM de MES-Tris.

En algunas realizaciones, la resina TMAE se lava con un segundo tampón de lavado que comprende MES-Tris y NaCl con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el segundo tampón de lavado comprende aproximadamente 5-75 mM de MES-Tris (por ejemplo, aproximadamente 5-70 mM, 5-60 mM, 5-50 mM, 5-40 mM, 5-30 mM, 10-60 mM, 10-50 mM, 10-40 mM, 10-30 mM o 15-25 mM) y aproximadamente 50-150 mM de NaCl (por ejemplo, aproximadamente 50-140 mM, 50-130 mM, 50-120 mM, 50-110 mM, 75-150 mM, 75-140 mM, 75-130 mM, 75-120 mM o 75-110 mM) con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el segundo tampón de lavado comprende aproximadamente 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM o 75 mM de MES-Tris y aproximadamente 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM de NaCl con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el segundo tampón de lavado comprende aproximadamente 20 mM de MES-Tris y aproximadamente 100 mM de NaCl con un pH de aproximadamente 7,0.

En algunas realizaciones, la resina TMAE, una vez cargada con la preparación impura, se eluye usando un tampón de elución que comprende MES-Tris y NaCl con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende aproximadamente 5-75 mM de MES-Tris (por ejemplo, aproximadamente 5-70 mM, 5-60 mM, 5-50 mM, 5-40 mM, aproximadamente 5-30 mM, 10-75 mM, 10-60 mM, 10-50 mM, 10-40 mM o 10-30 mM) y aproximadamente 150-300 mM de NaCl (por ejemplo, aproximadamente 150-250 mM, aproximadamente 180-260 mM, aproximadamente 200-280 mM, 200-260 mM, 200-240 mM, 210-300 mM, 210-280 mM, 210-260 mM o 210-240 mM) con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende aproximadamente 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM o 75 mM de MES-Tris y aproximadamente 150 mM, 180 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM, 230 mM, 240 mM, 250 mM, 260 mM, 270 mM, 280 mM, 290 mM o 300 mM de NaCl con un pH de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende aproximadamente 20 mM de MES-Tris y aproximadamente 220 mM de NaCl con un pH de aproximadamente 7,0.

En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico utiliza una columna seleccionada del grupo que consiste de Q SEPHAROSE™ Fast Flow, Q SEPHAROSE™ High Performance, Q SEPHAROSE™ XL, CAPTO™ Q, DEAE, TOYOPEARL GIGACAP® Q, FRACTOGEL® TMAE, ESHMUNO™ Q, NUVIA™ Q, o UNOSPHERE™ Q.

En algunas realizaciones, una cromatografía de modo mixto adecuada para la presente invención es la cromatografía de hidroxiapatita (HA).

En algunas realizaciones, una cromatografía de interacción hidrófoba adecuada para la presente invención

es la cromatografía de fenilo.

En algunas realizaciones, se realizan cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, con resina TMAE), cromatografía de modo mixto (por ejemplo, cromatografía de HA), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, cromatografía de fenilo) y cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía SP) en ese orden.

En algunas realizaciones, una cromatografía de afinidad adecuada para la presente invención utiliza un anticuerpo anti-Arilsulfatasa A (por ejemplo, un anticuerpo anti-Arilsulfatasa A humana).

En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico adecuada usa una columna con una capacidad de carga mayor de aproximadamente 4,5 g/l (por ejemplo, mayor que aproximadamente 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 10 g/l, 11 g/l, 12 g/l, 13 g/l, 14 g/l o 15 g/l). En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico adecuada usa una columna con una capacidad de carga que varía entre aproximadamente 4,5-20 g/l (por ejemplo, que varía entre aproximadamente 5-20 g/l; 5-19 g/l, 5-18 g/l, 5-17 g/l, 5-16 g/l, 5-15 g/l, 7,5-20 g/l, 7,5-19 g/l, 7,5-18 g/l, 7,5-17 g/l, 7,5-16 g/l, 7,5-15 g/l, 10-20 g/l, 10-19 g/l, 10-18 g/l, 10-17 g/l, 10-16 g/l, o 10-15 g/l). En realizaciones particulares, una capacidad de carga adecuada de la columna es de aproximadamente 10-15 g/l.

En algunas realizaciones, un paso de ultrafiltración adecuado para la presente invención es la ultrafiltración de flujo tangencial. En ciertas realizaciones, la ultrafiltración adecuada usa un filtro de membrana que comprende un tamaño de poro con un límite de peso molecular de por lo menos aproximadamente 10 kDA, por lo menos aproximadamente 20 kDA, por lo menos aproximadamente 30 kDA, por lo menos aproximadamente 40 kDA, por lo menos aproximadamente 50 kDA. En ciertas realizaciones, por lo menos el 75% de la ASA recombinante se retiene en la preparación impura. En ciertas realizaciones, por lo menos el 75% de la ASA recombinante permeada en el filtro. En ciertas realizaciones, un paso de ultrafiltración adecuado utiliza una membrana de polietersulfona o celulosa.

En algunas realizaciones, la clarificación de la preparación impura se realiza antes de la ultrafiltración de la preparación impura. En algunas realizaciones, un paso de clarificación adecuado para la presente invención es realizar filtración con uno o más filtros de profundidad. En algunas realizaciones determinadas, la filtración de la preparación impura se realiza usando una serie de filtros de profundidad. En algunas realizaciones determinadas, una serie adecuada de filtros de profundidad utiliza una membrana que comprende celulosa, tierra de diatomeas, polietersulfona, o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la ultrafiltración es seguida por uno o más pasos de filtración en profundidad y/o inactivación viral. En algunas realizaciones, el paso de inactivación viral comprende añadir un detergente a la preparación impura.

En algunas realizaciones, puede usarse un método de acuerdo con la presente invención para purificar una proteína ASA recombinante producida por células de mamífero cultivadas en suspensión. En algunas realizaciones, las células de mamífero se cultivan en un biorreactor. En algunas realizaciones, el medio es a base de suero. En algunas realizaciones, el medio es libre de suero. En algunas realizaciones, el medio libre de suero es un medio químicamente definido.

En algunas realizaciones, la preparación impura es una corriente de alimentación de un biorreactor de perfusión. En algunas realizaciones, la preparación impura se prepara a partir de medio (por ejemplo, a base de suero o libre de suero) que contiene proteína ASA recombinante secretada por células de mamífero. En algunas realizaciones, la preparación impura se descongela de una preparación de medio congelado.

El paso de (i) ultrafiltración, (ii) diafiltración o (iii) ultrafiltración/diafiltración combinadas comprende el intercambio de la proteína ASA recombinante purificada en un tampón de formulación de fármaco.

En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada de acuerdo con la presente invención contiene menos de aproximadamente 150 ng/mg, 140 ng/mg, 130 ng/mg, 120 ng/mg, 110 ng/mg, 100 ng/mg, 90 ng/mg, 80 ng/mg, 70 ng/mg, 60 ng/mg, 50 ng/mg, 40 ng/mg, 30 ng/mg, 20 ng/mg o 10 ng/mg de proteína de la célula huésped (HCP).

En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada, cuando se somete a SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie, no tiene nuevas bandas con una intensidad mayor que un control de ensayo al 1,0%.

En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada contiene menos de aproximadamente 150 pg/mg, 140 pg/mg, 130 pg/mg, 120 pg/mg, 110 pg/mg, 100 pg/mg, 90 pg/mg, 80 pg/mg, 70 pg/mg, 60 pg/mg, 50 pg/mg, 40 pg/mg, 30 pg/mg, 20 pg/mg o 10 pg/mg de ADN de la célula huésped.

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para purificar la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante que comprende los pasos de purificar la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante a partir de una preparación impura realizando uno o más pasos de cromatografía, en donde el primer
10 paso de cromatografía usa una columna con una capacidad de carga de más de aproximadamente 4,5 g de proteína/l de resina (por ejemplo, más de aproximadamente 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 10 g/l, 11 g/l, 12 g/l, 13 g/l, 14 g/l, 15 g/l, 16 g/l, 17 g/l, 18 g/l, 19 g/l o 20 g/l); agrupar el eluato de uno o más pasos de cromatografía; ajustar el pH del eluato agrupado a un pH igual o superior a aproximadamente 6,0; y someter el eluato con pH ajustado a un único paso de ultrafiltración y/o diafiltración después de uno o más pasos de cromatografía.

15 En algunas realizaciones, el paso de realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar una primera cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y una segunda cromatografía de intercambio iónico, en ese orden.

20 En algunas realizaciones, el uno o más pasos de cromatografía incluyen una cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones determinadas, la cromatografía de afinidad se realiza antes del primer paso de cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones determinadas, la cromatografía de afinidad se realiza después de realizar el segundo paso de cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la cromatografía de afinidad se realiza entre el primer paso de cromatografía de intercambio iónico y el segundo paso de cromatografía de intercambio iónico.

25 En algunas realizaciones, el paso de realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico, en ese orden.

30 En algunas realizaciones, el paso de realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico, en ese orden.

35 En algunas realizaciones, el paso de realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad, en ese orden.

40 En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico usa una columna con resina TMAE. En ciertas realizaciones, la columna TMAE tiene una capacidad de carga de aproximadamente 5-20 g de proteína/l de resina (por ejemplo, aproximadamente 5-19 g/l, 5-18 g/l, 5-17 g/l, 5-16 g/l, 5-15 g/l, 7,5-20 g/l, 7,5-19 g/l, 7,5-18 g/l, 7,5-17 g/l, 7,5-16 g/l, 7,5-15 g/l, 10-20 g/l, 10-19 g/l, 10-18 g/l, 10-17 g/l, 10-16 g/l, o 10-15 g/l).

En algunas realizaciones, se realiza un único paso de ultrafiltración y/o diafiltración después del uno o más pasos de cromatografía.

45 Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona una proteína recombinante de arilsulfatasa A (ASA) purificada de acuerdo con un método inventivo descrito en la presente y una composición farmacéutica que contiene la misma.

50 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende arilsulfatasa A (ASA) recombinante purificada que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1, en donde la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica de por lo menos aproximadamente 50 U/mg y además en donde la ASA recombinante purificada contiene menos de 150 ng/mg de proteína de la célula huésped (HCP) y/o 150 pg/mg de ADN de la célula huésped (HCD). En algunas realizaciones,
55 la ASA recombinante purificada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada contiene menos de aproximadamente 140 ng/mg, 130 ng/mg, 120 ng/mg, 110 ng/mg, 100 ng/mg, 90 ng/mg, 80 ng/mg, 70 ng/mg, 60 ng/mg, 50 ng/mg, 40 ng/mg, 30 ng/mg, 20 ng/mg o 10 ng/mg de proteína de la célula huésped (HCP). En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada contiene menos de aproximadamente 140 pg/mg, 130 pg/mg, 120 pg/mg, 110 pg/mg, 100 pg/mg, 90 pg/mg, 80
60 pg/mg, 70 pg/mg, 60 pg/mg, 50 pg/mg, 40 pg/mg, 30 pg/mg, 20 pg/mg, o 10 pg/mg de ADN de la célula huésped

En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica de por lo menos aproximadamente 50 U/mg, 60 U/mg, 70 U/mg, 80 U/mg, 90 U/mg, 100 U/mg, 110 U/mg, 120 U/mg, 130 U/mg, 140 U/mg. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica que varía de
65 aproximadamente 50-200 U/mg (por ejemplo, aproximadamente 50-190 U/mg, 50-180 U/mg, 50-170 U/mg, 50-160

U/mg, 50-150 U/mg, 50-140 U/mg, 50-130 U/mg, 50-120 U/mg, 50-110 U/mg, 50-100 U/mg, 60-140 U/mg, 60-130 U/mg, 60-120 U/mg, 60-110 U/mg, 60-100 U/mg, 70-140 U/mg, 70-130 U/mg, 70-120 U/mg, 70-110 U/mg, 70-100 U/mg, 80-140 U/mg, 80-130 U/mg, 80-120 U/mg, 80-110 U/mg, 80-100 U/mg, 90-140 U/mg, 90-130 U/mg, 90-120 U/mg, 90-110 U/mg, 90-100 U/mg, 100-140 U/mg, 100-130 U/mg, 100-120 U/mg, 100-110 U/mg, 110-140 U/mg, 110-130 U/mg, 110-120 U/mg, 120-140 U/mg, 120-130 U/mg, o 130-140 U/mg)..

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende arilsulfatasa A (ASA) recombinante purificada que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1, en donde la ASA purificada se caracteriza con un mapa de glucano que comprende uno o más grupos de pico seleccionados de los grupos de pico indicativos de neutro (grupo de pico 1), mono-sialilado (grupo de pico 2), manosa-6-fosfatado protegido (grupo de pico 3), di-sialilado (grupo de pico 4), mono-manosa-6-fosfatado (grupo de pico 5), híbrido (grupo de pico 6) y di-manosa-6-fosfatado (pico del grupo 7). En algunas realizaciones, la ASA purificada se caracteriza con un mapa de glucano que comprende por lo menos dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más o siete o más de los grupos pico 1-7. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una formulación que comprende la composición descrita en la presente y un portador fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación es adecuada para administración intravenosa. En algunas realizaciones, la formulación es adecuada para administración intratecal. En algunas realizaciones, la formulación es adecuada para administración subcutánea.

La proteína ASA recombinante purificada producida mediante el método de la invención puede usarse en métodos para tratar la enfermedad de leucodistrofia metacromática que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento la proteína ASA recombinante purificada, una composición farmacéutica o formulación descrita en la presente.

Como se usan en la presente, los términos "proteína ASA", "ASA", "enzima ASA" o equivalentes gramaticales, se refieren a una preparación de moléculas de proteína ASA recombinante a menos que se indique específicamente lo contrario.

Como se usa en esta solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Se pretende que cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente cubra cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada que sigue. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se proporciona solamente a modo de ilustración, no de limitación.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

Las Figuras descritas a continuación, que juntas forman el Dibujo, son solo con propósitos ilustrativos, no limitativos.

La **Figura 1** ilustra un diagrama de flujo generalizado de un proceso de purificación ejemplar.

La **Figura 2** ilustra un diagrama de flujo generalizado de un proceso de purificación ejemplar que implica un paso de agrupar el eluato de la columna de intercambio catiónico y ajustar el pH del eluato agrupado.

La **Figura 3** representa resultados ejemplares que ilustran la correlación entre el caudal de alimentación, la presión transmembrana (TMP) y el flujo de permeado para cada membrana.

La **Figura 4** representa geles SDS-PAGE (plata) ejemplares que muestran perfiles de banda similares para tanto Fractogel como Q FF durante todo el proceso.

La **Figura 5** representa resultados ejemplares que muestran que las ejecuciones de factibilidad que implican el paso de UFDF o UFDFDF individuales y ejecuciones de control mostraron patrones de banda similares al estándar de referencia (pista 3), lo que indica que la sustancia farmacológica de todas las ejecuciones mostró niveles comparablemente bajos de HCP.

La **Figura 6** representa resultados ejemplares que demuestran la comparabilidad entre experimentos (factibilidad) y ejecuciones de control con el estándar de referencia y que no se detectaron patrones de banda adicionales mediante SDS-PAGE (Coomassie).

DEFINICIONES

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, primero se definen ciertos términos a continuación. Las definiciones adicionales para los términos siguientes y otros términos se exponen a lo largo de la especificación.

Aproximadamente o alrededor de: como se usa en la presente, el término "aproximadamente" o "alrededor de", como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) de valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100% de un valor posible).

Biológicamente activo: como se usa en la presente, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y particularmente en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una parte de esa proteína o polipéptido que comparte por lo menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina típicamente una parte "biológicamente activa".

Receptor de manosa-6-fosfato independiente del catión (CI-MPR): como se usa en la presente, el término "receptor de manosa-6-fosfato independiente del catión (CI-MPR)" se refiere a un receptor celular que se une a los marcadores de manosa-6-fosfato (M6P) en los precursores de la hidrolasa de ácido en el aparato de Golgi que están destinados al transporte al lisosoma. Además de a los manosa-6-fosfatos, el CI-MPR también se une a otras proteínas, incluyendo IGF-II. El CI-MPR también se conoce como "receptor M6P/IGF-II", "receptor CI-MPR/IGF-II", "receptor IGF-II" o "receptor IGF2". Estos términos y abreviaturas de los mismos se usan indistintamente en la presente.

Cromatografía: como se usa en la presente, el término "cromatografía" se refiere a una técnica para la separación de mezclas. Típicamente, la mezcla se disuelve en un fluido denominado "fase móvil", que lo lleva a través de una estructura que contiene otro material denominado "fase estacionaria". La cromatografía en columna es una técnica de separación en la cual el lecho estacionario está dentro de un tubo, es decir, columna.

Diluyente: como se usa en la presente, el término "diluyente" se refiere a una sustancia diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, segura y no tóxica para su administración a un humano) útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Elución: como se usa en la presente, el término "elución" se refiere al proceso de extracción de un material de otro mediante lavado con un solvente. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio iónico, la elución es un proceso para lavar resinas cargadas para eliminar iones capturados.

Eluato: como se usa en la presente, el término "eluato" se refiere a una combinación de "portador" de fase móvil y el material de analito que emerge de la cromatografía, típicamente como resultado de la elución.

Terapia de reemplazo de enzimas (ERT): como se usa en la presente, el término "terapia de reemplazo de enzimas (ERT)" se refiere a cualquier estrategia terapéutica que corrige una deficiencia enzimática proporcionando la enzima desaparecida. Una vez administrada, la enzima es absorbida por las células y transportada al lisosoma, donde la enzima actúa para eliminar el material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Típicamente, para que la terapia de reemplazo de la enzima lisosómica sea eficaz, la enzima terapéutica se administra a los lisosomas en las células apropiadas en los tejidos objetivo donde se manifiesta el defecto de almacenamiento. Los procesos de purificación descritos en la presente pueden usarse para purificar y formular la arilsulfatasa A recombinante como sustancia farmacológica para ERT de MLD.

Equilibrar o equilibrio: como se usa en la presente, los términos "equilibrar" o "equilibrio" en relación con la cromatografía se refieren al proceso de equilibrar un primer líquido (por ejemplo, tampón) con otro, generalmente para lograr una distribución estable e igual de componentes del líquido (por ejemplo, tampón). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una columna cromatográfica puede equilibrarse pasando uno o más volúmenes de columna de un líquido deseado (por ejemplo, tampón) a través de la columna.

Mejorar, aumentar o reducir: como se usan en la presente, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de referencia, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en la presente, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en la presente. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico que el individuo que se está tratando, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que se está tratando (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo(s) control son comparables).

Impurezas: como se usa en la presente, el término "impurezas" se refiere a sustancias dentro de una cantidad confinada de líquido, gas o sólido, que difieren de la composición química del material o compuesto objetivo. Las impurezas también son referidas como contaminantes.

Carga: como se usa en la presente, el término "carga" se refiere, en cromatografía, a añadir un líquido o sólido que contiene una muestra a una columna. En algunas realizaciones, los componentes particulares de la muestra cargada en la columna se capturan luego a medida que la muestra cargada pasa a través de la

columna. En algunas realizaciones, los componentes particulares de la muestra cargada en la columna no son capturados por, o "fluyen a través de", la columna a medida que la muestra cargada pasa a través de la columna.

Polipéptido: como se usa en la presente, un "polipéptido", hablando de manera general, es una cadena de por lo menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir por lo menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a los otros por medio de por lo menos un enlace peptídico. Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos incluyen algunas veces aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, no obstante, son capaces de integrarse en una cadena de polipéptidos, opcionalmente.

Agrupación: como se usa en la presente, el término "agrupación" en relación con la cromatografía se refiere a la combinación de una o más fracciones de fluido que han pasado juntas a través de una columna. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una o más fracciones que contienen un componente deseado de una muestra que se ha separado por cromatografía (por ejemplo, "fracciones pico") pueden "agruparse" entre sí para generar una fracción "agrupada" individual.

Enzima de reemplazo: Como se usa en la presente, el término "enzima de reemplazo" se refiere a cualquier enzima que pueda actuar para reemplazar por lo menos en parte la enzima deficiente o faltante en una enfermedad a tratar. En algunas realizaciones, el término "enzima de reemplazo" se refiere a cualquier enzima que pueda actuar para reemplazar por lo menos en parte la enzima lisosómica deficiente o faltante en una enfermedad de almacenamiento lisosómico a tratar. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo (por ejemplo, rASA) es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamíferos o puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, MLD). Las enzimas de reemplazo adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo salvaje como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse a partir de fuentes naturales. Una enzima de reemplazo puede ser una enzima recombinante, sintética, activada por genes o natural.

Soluble: como se usa en la presente, el término "soluble" se refiere a la capacidad de un agente terapéutico de formar una solución homogénea. En algunas realizaciones, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en la que se administra y por la que se transporta al sitio de acción objetivo es suficiente para permitir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico al sitio de acción objetivo. Varios factores pueden afectar a la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar a la solubilidad de la proteína incluyen la fuerza iónica, la secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes o sales co-solubilizantes (por ejemplo, sales de calcio). En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención son solubles en su composición farmacéutica correspondiente.

Estabilidad: Como se usa en la presente, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (por ejemplo, una enzima recombinante) para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayoría de su actividad biológica y/o integridad fisicoquímica prevista) durante períodos de tiempo prolongados. La estabilidad de un agente terapéutico y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico pueden evaluarse durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, durante por lo menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En el contexto de una formulación, una formulación estable es aquella en la que el agente terapéutico en la misma conserva esencialmente su integridad física y/o química y su actividad biológica tras el almacenamiento y durante los procesos (como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, puede medirse mediante formación de agregados de alto peso molecular (HMW), pérdida de actividad enzimática, generación de fragmentos de péptidos y cambio de los perfiles de carga.

Procesamiento viral: como se usa en la presente, el término "procesamiento viral" se refiere a "eliminación viral", en la que los virus simplemente se eliminan de la muestra (por ejemplo, filtración viral), o "inactivación viral", en la que los virus permanecen en una muestra pero en una forma no infecciosa. En algunas realizaciones, la eliminación viral puede utilizar técnicas de nanofiltración y/o cromatográficas, entre otras. En algunas realizaciones, la inactivación viral puede utilizar inactivación por solventes, inactivación por detergentes, pasteurización, inactivación de pH ácida y/o inactivación ultravioleta, entre otras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se divulga un método mejorado para purificar la proteína ASA producida recombinantemente para la terapia de reemplazo enzimático. La presente invención proporciona un método para purificar una proteína ASA recombinante a partir de una preparación impura (por ejemplo, materiales biológicos no procesados como medio de cultivo celular que contiene ASA) usando un proceso que implica solo un único paso de ultrafiltración/diafiltración post-cromatográfica. Este proceso de UF/DF de un único paso se logra agrupando el eluato de los pasos de cromatografía y ajustando el pH del eluato agrupado a un pH de aproximadamente 5,8-7,0. En algunas realizaciones, este proceso simplificado se combina con pasos de cromatografía de alta capacidad de carga para facilitar la producción a gran escala de proteína ASA recombinante.

En las siguientes subsecciones se describen con más detalle varios aspectos de la invención. El uso de subsecciones no pretende limitar la invención como se reivindica. Cada subsección puede aplicarse a cualquier

aspecto de la invención como se reivindica. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Arilsulfatasa A

La arilsulfatasa A (ASA, ARSA o cerebroside-sulfatasa) es una enzima que descompone el 3-sulfato (o sulfatida) de cerebroside en cerebroside y sulfato. Específicamente, la galactosil sulfatida se metaboliza normalmente mediante la hidrólisis del enlace 3-O-sulfato para formar galactocerebroside mediante la acción combinada de la enzima lisosómica Arilsulfatasa A (EC 3.1.6.8) (Austin et al. Biochem J. 1964, 93, 15C- 17C) y una proteína activadora de esfingolípidos denominada saposina B. Una deficiencia de arilsulfatasa A se produce en todos los tejidos de pacientes con formas de leucodistrofia metacromática infantil tardía, juvenil y adulta. Como se usa en la presente, la proteína Arilsulfatasa A se denominará "ASA" o "ARSA" y la saposina B se denominará "Sap-B".

La arilsulfatasa A es una glicoproteína ácida con un bajo punto isoelectrico. Por encima de pH 6,5, la enzima existe como un monómero con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. La ASA existe como un octamero de 480 kDa en condiciones ácidas (pH $\leq$ aproximadamente 5,0), pero se disocia en dímeros a niveles de pH neutro. En la orina humana, la enzima consta de dos subunidades no idénticas de 63 y 54 kDa (Laidler PM et al. Biochim Biophys Acta. 1985, 827, 73-83). La arilsulfatasa A purificada de hígado humano, placenta y fibroblastos también consiste de dos subunidades de tamaños ligeramente diferentes que varían entre 55 y 64 kDa (Draper RK et al. Arch Biochemica Biophys. 1976, 177, 525-538, Waheed A et al. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1982, 363, 425-430, Fujii T et al. Biochim Biophys Acta. 1992, 15 1122, 93-98). Como en el caso de otras enzimas lisosómicas, la arilsulfatasa A se sintetiza en los ribosomas unidos a la membrana como un precursor glicosilado. Luego pasa a través del retículo endoplásmico y Golgi, donde sus oligosacáridos N-enlazados se procesan con la formación de oligosacáridos fosforilados y sulfatados del tipo complejo (Waheed A et al. Biochim Biophys Acta. 1985, 847, 53-61, Braulke T et al., Biochem Biophys Res Commun. 1987, 143, 178-185). En los fibroblastos cultivados normales, se produce un polipéptido precursor de 62 kDa, que se transloca a través de la unión al receptor de manosa-6-fosfato (Braulke T et al. J Biol Chem. 1990, 265, 6650-6655) a un endosoma prelisosómico ácido (Kelly BM et al. Eur J Cell Biol. 1989, 48, 71-78).

Los métodos descritos en la presente pueden usarse para purificar arilsulfatasa A a partir de cualquier fuente, por ejemplo, de tejidos o células cultivadas (por ejemplo, células humanas (por ejemplo, fibroblastos) que producen recombinantemente arilsulfatasa A). La arilsulfatasa A de cualquier origen incluyendo, pero no limitado as, humanos y otros animales, como mamíferos, puede producirse mediante los métodos descritos en la presente.

La longitud (18 aminoácidos) del péptido señal de la Arilsulfatasa A humana se basa en la secuencia de consenso y un sitio de procesamiento específico para una secuencia señal. Por lo tanto, a partir del ADNc de ASA humano deducido (números de registro de EMBL GenBank J04593 y X521151), la escisión del péptido señal tiene lugar en todas las células después del residuo número 18 (Ala), dando como resultado la forma madura de la arilsulfatasa A humana. Como se usa en la presente, la arilsulfatasa A recombinante se abreviará "rASA". La forma madura de arilsulfatasa A, incluyendo la forma madura de arilsulfatasa A humana, se denominará "mASA" y la ASA humana recombinante madura se denominará "mrhASA".

Se han demostrado múltiples formas de la arilsulfatasa A en la electroforesis y el enfoque isoelectrico de preparaciones enzimáticas de orina humana (Luijten JAFM et al. J Mol Med. 1978, 3, 213), leucocitos (Dubois et al. Biomedicine. 1975, 23, 116- 119, Manowitz P et al. Biochem Med Metab Biol. 1988, 39, 117-120), plaquetas (Poretz et al. Biochem J. 1992, 287, 979-983), fibroblastos cultivados (Waheed A et al. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1982, 363, 425-430, Stevens RL et al. Biochim Biophys Acta. 1976, 445, 661-671, Farrell DF et al. Neurology. 1979, 29, 16-20) e hígado (Stevens RL et al. Biochim Biophys Acta. 1976, 445, 661-671, Farrell DF et al. Neurología. 1979, 29, 16-20, Sarafian TA et al. Biochem Med. 1985, 33, 372-380). El tratamiento con endoglicosidasa H, sialidasa y fosfatasa alcalina reduce el tamaño y la complejidad molecular del patrón electroforético, lo que sugiere que gran parte de la heterogeneidad de carga de la arilsulfatasa A se debe a variaciones en el contenido de carbohidratos de la enzima.

El sitio activo de la arilsulfatasa A contiene un residuo esencial de histidina (Lee GD y Van Etten RL, Arch Biochem Biophys. 1975, 171, 424-434) y dos o más residuos de arginina (James GT, Arch Biochem Biophys. 1979, 97, 57 -62). Muchos aniones son inhibidores de la enzima a concentraciones en el intervalo milimolar o inferior.

Se ha descrito la estructura del gen de la arilsulfatasa A humana. Como se usa en la presente, este gen se denominará "ARSA". Sin embargo, "ARSA" también puede referirse a la proteína de la arilsulfatasa A en algunos casos. El gen ARSA está localizado cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 22 (22q13.31-qter), abarca 3,2 kb (Kreysing et al. Eur J Biochem. 1990, 191, 627-631) y consta de ocho exones que especifican la unidad enzimática de 507 aminoácidos (Stein et al. J Biol Chem. 1989, 264, 1252-1259). Se han detectado ARN mensajeros de 2,1, 3,7 y 4,8 kb en células de fibroblastos, con el mensaje de 2,1 kb aparentemente responsable de la mayor parte de la arilsulfatasa A activa generada por la célula (Kreysing et al. Eur J Biochem. 1990, 191, 627-631). La

secuencia de ARSA se ha depositado en la EMBL GenBank con el número de registro X521150. Las diferencias entre el ADNc publicado y la parte codificante del ARSA se han descrito por Kreysing et al. (Eur J Biochem. 1990, 191, 627-631). La secuencia de ADNc descrita originalmente por Stein et al. (JBiol Chem. 1989, 264, 1252-1259) y la secuencia de ADNc descrita por Kreysing et al. (Eur J Biochem. 1990, 191, 627-631) se han depositado en la EMBL GenBank con los siguientes números de registro J04593 y X521151, respectivamente.

Se han identificado varios polimorfismos y más de 40 mutaciones relacionadas con enfermedades en el gen ARSA (Gieselmann et al. Hum Mutat. 1994, 4, 233-242, Barth et al. Hum Mutat. 1995, 6, 170-176, Draghia et al. al. Hum Mutat. 1997, 9, 234-242) Las mutaciones relacionadas con enfermedades en el gen ARSA pueden clasificarse en dos grupos amplios que se correlacionan bastante bien con el fenotipo clínico de la MLD. Un grupo (I) no produce enzima activa, ni proteína inmunorreactiva, y no expresa actividad de ASA cuando se introduce en líneas celulares de animales cultivadas. El otro grupo (A) genera pequeñas cantidades de material de reacción cruzada y niveles bajos de enzima funcional en células cultivadas. Los individuos homocigotos para una mutación del grupo (I), o que tienen dos mutaciones diferentes de este grupo, expresan MLD infantil tardía. La mayoría de los individuos con una mutación de grupo tipo (I) y una de grupo tipo (A) desarrollan la forma de aparición juvenil, mientras que aquellos con dos mutaciones de grupo tipo (A) generalmente manifiestan MLD en adultos. Algunas de las mutaciones se han encontrado con relativa frecuencia, mientras que otras se han detectado solo en familias individuales. Es posible trazar mutaciones específicas a través de miembros de muchas familias, sin embargo la selección de portadores general no es todavía factible.

Además de las mutaciones relacionadas con enfermedades descritas anteriormente, se han identificado varios polimorfismos en el gen ARSA. Se ha encontrado una actividad de ASA extremadamente baja en algunos padres clínicamente normales de pacientes con MLD y también en la población general. Esta llamada ASA de pseudodeficiencia se ha asociado con un polimorfismo común del gen ARSA (Gieselmann et al. Dev Neurosci. 1991, 13, 222-227).

Proteína ASA recombinante

Como se usa en la presente, el término "proteína ASA recombinante" se refiere a cualquier molécula o una porción de una molécula que puede sustituir por lo menos una actividad parcial de la proteína Arilsulfatasa A (ASA) de origen natural o rescatar uno o más fenotipos o síntomas asociados con la deficiencia de ASA. Como se usa en la presente, los términos "enzima ASA recombinante" y "proteína ASA recombinante", y equivalentes gramaticales, se usan de manera intercambiable. En algunas realizaciones, la presente invención se usa para purificar una proteína ASA recombinante que es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar o idéntica a la proteína ASA humana madura.

Típicamente, la ASA humana se produce como una molécula precursora que se procesa en una forma madura. Este proceso generalmente se produce eliminando el péptido señal de 18 aminoácidos. Típicamente, la forma precursora también es referida como precursora de longitud completa o proteína ASA de longitud completa, que contiene 507 aminoácidos. Los 18 aminoácidos N-terminales se escinden, lo que da como resultado una forma madura que tiene 489 aminoácidos de longitud. Por tanto, se contempla que generalmente no se requieran los 18 aminoácidos N-terminales para la actividad de la proteína ASA. Las secuencias de aminoácidos de la forma madura (SEQ ID NO: 1) y el precursor de longitud completa (SEQ ID NO: 2) de una proteína ASA humana típica de tipo salvaje o de origen natural se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Arilsulfatasa A Humana

Forma Madura	RPPNIVLIFADDLGYGDLGCGYGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSLCTPS RAALLTGRLPVRMGMPGVLPSSRGGLPLEEVTVAEVLARGYLTMAGKWHL GVGPEGAFLLPQHGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPI P LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMAAQRQDRPFFLYYASHHHTHY PQFS GQSFAERSGRGPFGLDLMELDAAVGTLMTAIGDLGLLEETLVIIFTADNGPETMR MSRGGCSGLLRGKGTTEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAA LAGAPLPNVTLDFGLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSPDEVRGVFAVRTGKYKA HFFTQGSASDSTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLKDPGENYNLLGGVAGATP EVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPD PHA (SEQ ID NO:1)
--------------	---

(continuación)

Precursor de Longitud Completa	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGCYGHPSSTTPNLDQLAA GGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMPGVLPVSSRGGLPLEEVTVA EVLAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRLGIPYSHDQGPCQNLTFCF PPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMAQAQRQD RPFLLYYASHHHTHYPOFSGQSFAERSGRGPFSGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGL LEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAP GVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLTDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYP YPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTTQGSASDSTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLS KDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQ ICCHPGCTPRPACCHCPDPA (SEQ ID NO:2)
---------------------------------------	--

Por tanto, en algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada por las realizaciones de la presente invención es la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante puede ser un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana madura. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana madura puede ser una proteína ASA humana madura modificada que contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína ASA tipo salvaje o de origen natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), mientras se mantiene una actividad de proteína ASA sustancial. Por tanto, una proteína ASA recombinante es sustancialmente homóloga a la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la SEQ ID NO: 1. Una proteína ASA recombinante purificada mediante las realizaciones de la presente invención es sustancialmente idéntica a la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana madura. 99% o más idéntico al SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana madura. 99% o más idéntico al SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana madura.

En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada mediante las realizaciones de la presente invención es proteína ASA de longitud completa. Una proteína ASA recombinante puede ser un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana de longitud completa. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana de longitud completa puede ser una proteína ASA humana de longitud completa modificada que contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína ASA de longitud completa de tipo salvaje o de origen natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), a la vez que mantiene una actividad de proteína ASA sustancial. Por tanto, una proteína ASA recombinante es sustancialmente homóloga a la proteína ASA humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada mediante las realizaciones de la presente invención es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada mediante las realizaciones de la presente invención contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana de longitud completa. Como se usa en la presente, una proteína ASA de longitud completa contiene típicamente una secuencia de péptido señal.

Los homólogos o análogos de proteínas ASA humanas pueden prepararse de acuerdo con los métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidos por un experto en la técnica, como los que se encuentran en las referencias que compilan tales métodos. En algunas realizaciones, las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los grupos siguientes: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D. En algunas realizaciones, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos.

En algunas realizaciones, las proteínas ASA recombinantes pueden contener una fracción que se une a un receptor en la superficie de las células objetivo para facilitar la captación celular y/o el direccionamiento lisosómico. Por ejemplo, dicho receptor puede ser el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) que se une a los residuos de manosa-6-fosfato (M6P). Además, el CI-MPR también se une a otras proteínas, incluyendo IGF-II. En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante contiene residuos de M6P en la superficie de la

proteína. En particular, una proteína ASA recombinante puede contener oligosacáridos bis-fosforilados que tienen una afinidad de unión más alta para CI-MPR. En algunas realizaciones, una enzima adecuada contiene hasta aproximadamente una media de aproximadamente por lo menos un 20% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. En otras realizaciones, una enzima adecuada puede contener aproximadamente un 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima.

En algunas realizaciones, las enzimas de ASA recombinantes pueden fusionarse con una fracción de direccionamiento lisosómica que es capaz de unirse a un receptor en la superficie de las células objetivo. Una fracción de direccionamiento lisosómica adecuada puede ser IGF-I, IGF-II, RAP, p97 y variantes, homólogos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, incluyendo aquellos péptidos que tienen una secuencia por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90 %, o 95% idéntica a una secuencia de péptido de IGF-I, IGF-II, RAP, p97 humana madura de tipo salvaje). La fracción de direccionamiento lisosómica puede conjugarse o fusionarse con una proteína o enzima ASA en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o internamente.

Producción de proteínas ASA recombinantes

La presente invención puede usarse para purificar una proteína ASA recombinante producida por varios medios. Por ejemplo, una proteína ASA puede producirse recombinantemente utilizando un sistema de células huésped diseñado para expresar un ácido nucleico que codifica ASA. Alternativamente, puede producirse una proteína ASA activando un gen ASA endógeno.

Se contempla que la presente invención pueda usarse para purificar una proteína ASA recombinante producida usando varios sistemas de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, células de huevo, baculovirus, plantas, levaduras o mamíferos.

En algunas realizaciones, las enzimas ASA se producen en células de mamíferos. Los ejemplos no limitativos de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36: 59,1977); línea celular de fibrosarcoma humano (por ejemplo, HT1080); células de riñón de cría de hámster (BHK21, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216, 1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

En algunas realizaciones, los métodos inventivos de acuerdo con la presente invención se usan para purificar enzimas ASA recombinantes producidas a partir de células humanas (por ejemplo, HT1080). En algunas realizaciones, los métodos inventivos de acuerdo con la presente invención se usan para purificar enzimas ASA recombinantes producidas a partir de células CHO.

Típicamente, las células que están diseñadas para expresar ASA recombinante pueden comprender un transgen que codifica una proteína ASA recombinante descrita en la presente. Debe apreciarse que los ácidos nucleicos que codifican ASA recombinante pueden contener secuencias reguladoras, secuencias de control de genes, promotores, secuencias no codificantes y/u otras secuencias apropiadas para expresar la ASA recombinante. Típicamente, la región codificante está enlazada operativamente con uno o más de estos componentes de ácido nucleico.

Las "secuencias reguladoras" se refieren típicamente a secuencias de nucleótidos localizadas en sentido ascendente (secuencias no codificantes 5'), dentro, o secuencia abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líderes de traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de poliadenilación. Algunas veces, las "secuencias reguladoras" también son referidas como "secuencias de control de genes".

"Promotor" se refiere típicamente a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se localiza 3' a una secuencia promotora. La secuencia promotora consiste de elementos en sentido ascendente proximales y más distales, los últimos elementos a menudo son referidos como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad de tejido de un promotor. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de

diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en etapas diferentes del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales.

Las "secuencias no codificantes 3' " se refieren típicamente a secuencias de nucleótidos localizadas en sentido descendente de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento de ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por afectar a la adición de tractos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm.

La "secuencia líder de traducción" o "secuencia no codificantes 5' " se refiere típicamente a una secuencia de nucleótidos localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado en sentido ascendente de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede afectar al procesamiento de la transcripción primaria al ARNm, la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción.

Típicamente, el término "enlazado operativamente" o "enlazado operablemente" se refiere a la asociación de dos o más fragmentos de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico para que la función de uno se vea afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden enlazarse operativamente a secuencias reguladoras en orientación de sentido o antisentido.

La región codificante de un transgen puede incluir una o más mutaciones silenciosas para optimizar el uso de codones para un tipo de célula particular. Por ejemplo, los codones de un transgen ASA pueden optimizarse para la expresión en una célula de vertebrado. En algunas realizaciones, los codones de un transgen ASA pueden optimizarse para la expresión en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, los codones de un transgen ASA pueden optimizarse para la expresión en una célula humana.

Opcionalmente, un constructo puede contener componentes adicionales como uno o más de los siguientes: un sitio de corte y empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado, un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado, y una región de unión a la matriz (MAR) u otro elemento conocido en la técnica que mejore la expresión de la región donde se inserta.

Una vez transfectados o transducidos en células huésped, un vector adecuado puede expresarse extracromosómicamente (episomalmente) o integrarse en el genoma de la célula huésped.

Medio y condición de cultivo celular

Pueden usarse varios medios y condiciones de cultivo celular para producir una proteína ASA recombinante. Por ejemplo, puede producirse una proteína ASA recombinante en medio que contiene suero o libre de suero. En algunas realizaciones, se produce una proteína ASA recombinante en medio libre de suero. En algunas realizaciones, se produce una proteína ASA recombinante en un medio libre de animales, es decir, un medio que carece de componentes derivados de animales. En algunas realizaciones, se produce una proteína ASA recombinante en un medio químicamente definido. Como se usa en la presente, el término "medio nutriente químicamente definido" se refiere a un medio del que se conocen sustancialmente todos los componentes químicos. En algunas realizaciones, un medio nutriente químicamente definido está libre de componentes derivados de animales como suero, proteínas derivadas de suero (por ejemplo, albúmina o fetuina) y otros componentes. En algunos casos, un medio químicamente definido comprende una o más proteínas (por ejemplo, factores de crecimiento de proteínas o citoquinas). En algunos casos, un medio nutriente químicamente definido comprende uno o más hidrolizados de proteínas. En otros casos, un medio nutriente químicamente definido es un medio libre de proteínas, es decir, un medio libre de suero que no contiene proteínas, hidrolizados o componentes de composición desconocida.

En algunas realizaciones, un medio químicamente definido puede suplementarse con uno o más componentes derivados de animales. Tales componentes derivados de animales incluyen, pero no están limitados a, suero de ternera fetal, suero de caballo, suero de cabra, suero de burro, suero humano, y proteínas derivadas de suero como albúminas (por ejemplo, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano). Aunque la adición de suero es deseable ya que contiene constituyentes, como vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas, también constituye una fuente concentrada de proteínas exógenas que pueden impedir la purificación de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las proteínas fetuinas son una familia de proteínas séricas relacionadas que son secretadas por las células, principalmente los hepatocitos, y tienen tres dominios característicos (Brown WM, et al., Eur J Biochem. 1 de abril de 1992; 205(1):321-31) Las fetuinas son abundantes durante la vida fetal y, por lo tanto, a menudo abundan en los sueros derivados de feto comercialmente disponibles y constituyen un contaminante proteico importante durante la purificación. Por tanto, en algunas realizaciones, un medio adecuado es un medio

libre de xeno, por ejemplo, un medio que no contiene ningún suero bovino o componentes derivados de suero bovino. Por ejemplo, un medio libre de xeno puede contener uno o más de albúmina de suero humano, transferrina humana, insulina humana y lípidos humanos. En algunas realizaciones, un medio adecuado contiene suero desprovisto de fetuina. La fetuina puede desproverse del suero usando varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la fetuina puede desproverse del suero mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos. (Ver, por ejemplo, Toroian D y Price PA, *Calcif Tissue Int* (2008) 82:116-126) En algunas realizaciones, un medio adecuado está libre de fetuina.

Pueden usarse varias condiciones de cultivo celular para producir proteínas ASA recombinantes a gran escala incluyendo, pero no limitadas a, cultivos en botella de rodillo, cultivos por lotes en biorreactor y cultivos por lotes alimentados en biorreactor. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante es producida por células cultivadas en suspenso. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante es producida por células adherentes.

Purificación de la arilsulfatasa A recombinante

En la presente se divulgan procesos de purificación para la producción de arilsulfatasa A ("ASA"), particularmente sustancias farmacológicas de ASA humano recombinante ("rhASA"). Pueden usarse una variedad de técnicas, en su totalidad o en parte, opcionalmente con modificaciones como se describe en la presente, para producir una sustancia farmacológica de ASA purificada. Por ejemplo, la Figura 1 muestra un diagrama de flujo generalizado de una realización de la invención. Este proceso de purificación ejemplar comienza con la descongelación y agrupación de la masa no purificada de rhASA (UPB), que luego se captura y filtra mediante ultrafiltración y diafiltración ("UFD"). Después de la filtración, el material capturado puede inactivarse viralmente (no mostrado) antes de la purificación cromatográfica. En la realización particular representada, los siguientes cuatro pasos del proceso de purificación utilizan sucesivamente cuatro columnas cromatográficas: una columna de intercambio aniónico (por ejemplo, una columna Q Sepharose Fast Flow ("Q-FF")), una columna de hidroxapatita de cerámica Tipo I (HA), una columna de fenilo y una columna de intercambio catiónico (por ejemplo, SP). Después del cuarto y último paso de cromatografía, el eluato SP se concentra y se diafiltra usando ultrafiltración de flujo tangencial. El filtrado resultante se filtra luego por virus (por ejemplo, a través de un filtro de reducción viral Planova® 20N) seguido de un segundo paso de concentración y diafiltración para lograr una concentración final de proteína objetivo. En comparación, la Figura 2 representa otra realización ejemplar de la invención. El proceso procede como en la Figura 1, opcionalmente usando una o más resinas cromatográficas diferentes (por ejemplo, una resina de intercambio aniónico TMAE). Sin embargo, después del cuarto y último paso de cromatografía, se agrupa el eluato SP y se ajusta el pH de la agrupación, por ejemplo, aproximadamente 6,0. El eluato de intercambio catiónico con pH ajustado resultante se filtra luego viralmente seguido de un único paso de concentración y diafiltración para lograr una concentración final de proteína objetivo. En la presente se describen mejoras opcionales de estos procesos y realizaciones adicionales.

Como se usa en la presente, un "contaminante" es un material que es diferente del producto de polipéptido deseado, por ejemplo, arilsulfatasa A (ASA). El contaminante puede ser una variante del polipéptido deseado (por ejemplo, una variante desamidada o una variante de amino-aspartato del polipéptido deseado) u otra molécula, por ejemplo, polipéptido, ácido nucleico y endotoxina.

Como se usa en la presente, "purificar" un polipéptido de una composición o muestra que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes significa aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición o la muestra eliminando (total o parcialmente) por lo menos un contaminante de la composición o muestra. Un "paso de purificación" puede ser parte de un proceso de purificación global que da como resultado una composición que comprende por lo menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, o 99,9% en peso del polipéptido de interés, en base al peso total de la composición. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de: transferencia Western de proteína de la célula huésped (HCP), tinción con Coomassie SDS-PAGE, tinción con plata SDS-PAGE, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es por lo menos de aproximadamente 50 U/mg, 60 U/mg, 70 U/mg, 80 U/mg, 90 U/mg, 100 U/mg, 110 U/mg, 120 U/mg, 130 U/mg, 140 U/mg, por ejemplo, como se determina mediante un método descrito en la presente. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica que varía de aproximadamente 50-200 U/mg (por ejemplo, aproximadamente 50-190 U/mg, 50-180 U/mg, 50-170 U/mg, 50-160 U/mg, 50-150 U/mg, 50-140 U/mg, 50-130 U/mg, 50-120 U/mg, 50-110 U/mg, 50-100 U/mg, 60-140 U/mg, 60-130 U/mg, 60-120 U/mg, 60-110 U/mg, 60-100 U/mg, 70-140 U/mg, 70-130 U/mg, 70-120 U/mg, 70-110 U/mg, 70-100 U/mg, 80-140 U/mg, 80-130 U/mg, 80-120 U/mg, 80-110 U/mg, 80-100 U/mg, 90-140 U/mg, 90-130 U/mg, 90-120 U/mg, 90-110 U/mg, 90-100 U/mg, 100-140 U/mg, 100-130 U/mg, 100-120 U/mg, 100-110 U/mg, 110-140 U/mg, 110-130 U/mg, 110-120 U/mg, 120-140 U/mg, 120-130 U/mg, o 130-140 U/mg), por ejemplo, como se determina por un método descrito en la presente.

Un material de partida para el proceso de purificación es cualquier preparación impura. Por ejemplo, una preparación impura puede ser un medio de cultivo celular no procesado que contiene proteína ASA recombinante

secretada por las células (por ejemplo, células de mamífero) que producen proteína ASA o lisados celulares brutos que contienen proteína ASA. En algunas realizaciones, una preparación impura puede ser medio celular parcialmente procesado o lisados celulares. Por ejemplo, el medio celular o los lisados celulares pueden concentrarse, diluirse, tratarse con inactivación viral, procesamiento viral o eliminación viral. En algunas realizaciones, la eliminación viral puede utilizar técnicas de nanofiltración y/o cromatográficas, entre otras. En algunas realizaciones, la inactivación viral puede utilizar inactivación con solventes, inactivación con detergentes, pasteurización, inactivación de pH ácida y/o inactivación ultravioleta, entre otras. El medio celular o los lisados celulares también pueden tratarse con proteasa, ADNasas y/o RNasas para reducir el nivel de proteína y/o ácidos nucleicos de la célula huésped (por ejemplo, ADN o ARN). En algunas realizaciones, los materiales biológicos no procesados o parcialmente procesados (por ejemplo, medio celular o lisado celular) pueden congelarse y almacenarse a una temperatura deseada (por ejemplo, 2-8° C, -4° C, -25° C, -75° C) durante un período de tiempo y luego descongelarse para purificación. Como se usa en la presente, una preparación impura también es referida como material de partida o material de carga.

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los pasos siguientes: filtración en profundidad, inactivación viral, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico), cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba, ultrafiltración/diafiltración y filtración por eliminación viral. En algunas realizaciones, los métodos de purificación descritos en la presente incluyen además cromatografía de afinidad.

En los pasos de cromatografía, el volumen apropiado de resina usado cuando se compacta en una columna de cromatografía se refleja en las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo de, por ejemplo, la cantidad de proteína en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina usada. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente divulgación aumentar la escala del proceso de producción así como el proceso de purificación para obtener la producción y purificación de ASA a escala industrial. Por consiguiente, parámetros como el tamaño de la columna, el diámetro y la velocidad de flujo pueden aumentarse para cumplir con la velocidad y la eficiencia de tal producción a gran escala. En algunas realizaciones, el diámetro de la columna varía de aproximadamente 50-100 mm, el volumen varía de aproximadamente 100-300 ml, y el caudal es de aproximadamente 40-400 cm/hora (por ejemplo, entre aproximadamente 100 cm/hora y 150 cm/hora) o aproximadamente de 5 a 100 ml.

Ultrafiltración - Captura

En algunas realizaciones de la invención, los métodos de purificación divulgados en la presente incluyen uno o más pasos de ultrafiltración en sentido ascendente para capturar ASA (por ejemplo, ASA recombinante humana) producida a partir de un biorreactor de perfusión. La ultrafiltración, como se usa en la presente, se refiere a la filtración de membrana con tamaños de poro de filtro en la magnitud de 0,001 y 0.1 μm , que puede usarse para concentrar y desalar moléculas disueltas (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y otras biomoléculas), intercambiar tampones y fraccionamiento bruto. Los métodos de ultrafiltración para su uso en realizaciones de la invención incluyen ultrafiltración de flujo tangencial o filtración de flujo cruzado.

La filtración de flujo tangencial y la ultrafiltración, como se usa en la presente, se refiere a disposiciones donde la corriente de alimentación pasa paralela a la cara de la membrana a medida que una parte pasa a través de la membrana (permeado) mientras que el resto (retenado) se recircula de vuelta al depósito de alimentación. En algunas realizaciones, el tamaño de poro de los filtros de ultrafiltración de flujo tangencial se elige para permitir que la ASA recombinante permee a través del filtro. En otras realizaciones, el tamaño de poro se elige para retener sustancialmente toda la ASA en la alimentación que pasa sobre el filtro. Como se ha indicado en otra parte, la ASA existe como un octámero de 480 kDa en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq$ aproximadamente 5,0), pero se disocia en dímeros a niveles de pH neutro. Por tanto, el pH de la alimentación puede ajustarse en combinación con la selección del tamaño de poro apropiado para retener la ASA en la membrana del filtro o permitir que pase a través de un permeado.

El tamaño de poro puede seleccionarse con límites de peso molecular de por lo menos 10 kDa, por lo menos 20 kDa, por lo menos 30 kDa, por lo menos 40 kDa, por lo menos 50 kDa, por lo menos 60 kDa, por lo menos 70 kDa, por lo menos 80 kDa, por lo menos 90 kDa, por lo menos 100 kDa, por lo menos 300 kDa, por lo menos 400 kDa o por lo menos 500 kDa. Por ejemplo, un filtro con un tamaño de poro de por lo menos 10 kDa retendrá en la alimentación la mayoría de las proteínas con pesos moleculares de aproximadamente 11 kDa o más. Como otro ejemplo, un filtro con un tamaño de poro de por lo menos 400 kDa retendrá la mayoría de las proteínas con pesos moleculares superiores a 400 kDa. En algunas realizaciones, la tasa de retención de alimentación es de por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o más. De igual manera, el tamaño de poro puede seleccionarse para el aislamiento de permeados de tamaño particular. Por ejemplo, Un filtro con un tamaño de poro de por lo menos 500 kDa permitirá que la mayoría de las proteínas con pesos moleculares menores de 500 kDa permeen. En algunas realizaciones, la tasa de permeación es de por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o más.

El área o la capacidad de filtración también pueden optimizarse para su uso en los procesos divulgados en la presente. Las consideraciones que afectan a la selección del área de filtración incluyen robustez, costo, caudal de alimentación (es decir, velocidad de flujo cruzado), presión transmembrana, caudal de permeado, ajuste de planta y rendimiento. En algunas realizaciones, el flujo de permeado es de aproximadamente 50-100 litros por metro² por hora ("LMH"). En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 250-600 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 250-350 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 175-245 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 170-230 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 120-160 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 15-30 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el flujo de alimentación es de aproximadamente 11-21 LMH, inclusive. En algunas realizaciones, el área de filtración es de aproximadamente 0,02 m², aproximadamente 0,14 m², aproximadamente 0,7 o aproximadamente 3,5 m². En realizaciones particulares, la presión transmembrana es de aproximadamente 55-60 psi, inclusive. En algunas realizaciones, la presión transmembrana es de aproximadamente 15-25 psi, inclusive. En algunas realizaciones, la presión transmembrana es de aproximadamente 10-20 psi, inclusive. En algunas realizaciones, la presión transmembrana es de aproximadamente 5-15 psi.

Los filtros de ultrafiltración para su uso en realizaciones de la invención pueden comprender materiales de membrana conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no están limitados a, polietersulfona y celulosa estabilizada. Un casete de filtro ejemplar para su uso en realizaciones de la invención es el Sartorius ECO®. Otro casete de filtro ejemplar para su uso en realizaciones de la invención es la membrana estándar Sartorius HYDROSART® de 30 kD.

Filtración en profundidad

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de filtración en profundidad. Los filtros de profundidad son la variedad de filtros que usan un medio de filtración poroso para retener partículas en todo el medio, en lugar de solo en la superficie del medio. Contienen medios de filtración que tienen una densidad graduada, lo que permite que las partículas más grandes queden atrapadas cerca de la superficie del filtro, mientras que las partículas más pequeñas penetran en las áreas abiertas más grandes en la superficie del filtro, solo para quedar atrapadas en las aberturas más pequeñas más cercanas al centro del filtro. Aunque ciertas realizaciones emplean pasos de filtración en profundidad solo durante la fase de recuperación en sentido ascendente (es decir, antes de los pasos de purificación cromatográfica posteriores), otras realizaciones emplean filtros de profundidad durante una o más fases adicionales de purificación. En algunas realizaciones de la invención, se usa un filtro de profundidad Cuno Zeta Plus

La filtración en profundidad puede ser seguida opcionalmente por una filtración de 0,45 micras ($\pm 2 \mu\text{m}$) para eliminar particulados y reducir la carga biológica en preparación para el procesamiento en sentido descendente.

Inactivación viral

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de inactivación viral. En algunas realizaciones, la inactivación viral comprende un solvente y/o un detergente. El solvente o detergente puede incluir, por ejemplo, polisorbato 80, tri-n-butil-fosfato (TnBP), o ambos. La inactivación viral puede implicar 3-24 horas de incubación en el solvente o detergente. En otra realización, la inactivación viral comprende filtración de virus, por ejemplo, usando un filtro Planova™.

Se entiende que estos métodos están destinados a dar lugar a una preparación de una enzima, que está sustancialmente libre de virus infecciosos y que puede denominarse un "producto seguro contra virus". Además, se contempla que los varios métodos pueden usarse independientemente o en combinación.

La inactivación de virus puede lograrse mediante la adición de uno o más "agentes de inactivación de virus" a una solución que comprende la enzima. En algunas realizaciones, se realiza un paso de inactivación de virus antes de los pasos de purificación cromatográfica (es decir, antes de cargar la preparación impura en la primera columna de cromatografía) para asegurar que el agente no esté presente en el producto final en ninguna cantidad o concentración que comprometa la seguridad del producto cuando se use como producto farmacéutico o cuando el producto se use para la preparación de un producto farmacéutico; otras realizaciones emplean filtros de profundidad durante una o más fases adicionales de purificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un método inventivo de acuerdo con la invención incluye además un paso de eliminación viral después de la última columna de cromatografía.

Se pretende que el término "agente de inactivación de virus" denote un agente (por ejemplo, detergente) o un método, que puede usarse para inactivar virus envueltos con lípidos así como virus no envueltos con lípidos. Debe entenderse que el término "agente de inactivación de virus" abarca tanto una combinación de tales agentes y/o métodos, cuando sea apropiado, como solo un tipo de tal agente o método.

Los agentes de inactivación de virus típicos son detergentes y/o solventes, más típicamente mezclas de detergentes-solventes. Debe entenderse que el agente de inactivación de virus es opcionalmente una mezcla de uno o más detergentes con uno o más solventes. Puede usarse una amplia variedad de detergentes y solventes para la inactivación de virus. El detergente puede seleccionarse del grupo que consiste de detergentes no iónicos e iónicos y se selecciona para que sea sustancialmente no desnaturizante. Típicamente, se usa un detergente no iónico ya que facilita la eliminación posterior del detergente de la preparación de rASA en los pasos de purificación posteriores. Los detergentes adecuados se describen, por ejemplo, por Shanbrom et al., en la Patente de Estados Unidos 4.314.997 y la Patente de Estados Unidos 4.315.919. Los detergentes típicos son los vendidos con las marcas comerciales Triton X-100 y Tween 20 o Tween 80. Los solventes preferidos para su uso en agentes de inactivación de virus son los di- o trialkilfosfatos como se describe, por ejemplo, por Neurath y Horowitz en la Patente de Estados Unidos 4.764.369. Un solvente típico es el tri(n-butil) fosfato (TnBP). Un agente de inactivación de virus especialmente preferido para la puesta en práctica de la presente invención es Tween el 80, pero alternativamente pueden usarse otros agentes o combinaciones de agentes. El agente típico se añade a un volumen tal que la concentración de Tween-80 en la solución que contiene ASA esté dentro del intervalo de aproximadamente el 0,5-4,0% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 1% en peso. Luego se puede añadir TnBP a una concentración final del 0,3% calculada en base al nuevo volumen de la muestra que contiene ASA.

El paso de inactivación del virus se lleva a cabo bajo condiciones que inactivan los virus envueltos que dan como resultado una solución que contiene rhASA sustancialmente segura para virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-37° C, como 19-28° C, 23-27° C, típicamente alrededor de 25° C, y un tiempo de incubación que se ha visto que es efectivo mediante estudios de validación. Generalmente, un tiempo de incubación de 1-24 horas es suficiente, preferiblemente 10-18 horas, como aproximadamente 14 horas, para asegurar una inactivación del virus suficiente. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente de inactivación del virus empleado, el pH y la concentración de proteínas y el contenido de lípidos de la solución.

Se contempla que también puedan emplearse otros métodos para eliminar o inactivar virus para producir un producto seguro para virus, como la adición de azul de metileno con inactivación posterior mediante radiación con luz ultravioleta.

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de filtración por eliminación viral. Típicamente, la filtración de virus se realiza después de la purificación de la enzima mediante uno o más pasos de cromatografía. En algunas realizaciones, el paso de filtración de virus se realiza mediante el pase de la solución que contiene ASA que es un resultado de un paso de purificación a través de un filtro estéril y, posteriormente, el pase de la solución filtrada estéril a través de un nanofiltro. Por "filtro estéril" se entiende un filtro, que eliminará sustancialmente todos los microorganismos capaces de propagarse y/o provocar infección. Mientras que es típico que el filtro tenga un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 micras, el tamaño de poro podría variar entre aproximadamente 0,05 y 0,3 micras. Puede ser factible reemplazar o combinar la filtración de virus de la muestra cómo se realiza en el proceso de purificación con poner en contacto la muestra con un detergente.

Algunas realizaciones de la invención incluyen por lo menos dos pasos de inactivación viral y/o filtración. Por ejemplo, la inactivación viral antes de la cromatografía en columna puede combinarse para la eliminación viral después de que se hayan completado todos los pasos cromatográficos. La eliminación viral poscromatográfica puede realizarse antes o después de uno o más pasos de ultrafiltración/diafiltración (UFDF) (por ejemplo, ultrafiltración de flujo tangencial). En un ejemplo específico, el eluido se obtiene de un paso final de purificación cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico (SP)), y el pH de la agrupación de eluato se ajusta a aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5 o aproximadamente 7,0, seguido de filtración viral. Por tanto, en ciertas realizaciones, un único paso de UFDF está precedido por filtración viral (por ejemplo, usando un filtro Planova™). En otro ejemplo, el eluato se obtiene de un paso final de purificación cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico (SP)), se somete a un primer paso de UFDF sin ajuste de pH, seguido de filtración viral y un segundo paso de UFDF.

En ciertas realizaciones, la agrupación de eluato de intercambio catiónico ajustado por pH se filtra viralmente en un filtro Planova 20N. En algunas realizaciones, el rendimiento relativo para la entrada después de la filtración viral del eluato de intercambio catiónico ajustado por pH está entre aproximadamente el 90-100%; es decir, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más, como se evalúa por absorbancia A280. Por tanto, en algunas realizaciones, esencialmente no se pierde ASA recombinante durante la filtración viral. El rendimiento para la filtración viral es significativo ya que verifica que el ajuste del pH a aproximadamente 6,0 permite que los octámeros de ASA (que tienen aproximadamente 20 nm de diámetro) se disocien en la forma dimérica. Por tanto, el tamaño de poro de un filtro viral puede seleccionarse para garantizar que solo se filtre la forma dimérica (es decir, que la forma octamérica pueda ser retenida por el filtro o, provocar la obstrucción del filtro viral). Por ejemplo, un filtro viral con un tamaño de poro de 20 nm retendrá la forma octamérica de ASA, pero no la forma dimérica.

Cromatografía de afinidad

5 Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de inmovilización de anticuerpos, cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados y/o cromatografía de afinidad de ligando inmovilizado).

10 Brevemente, la cromatografía de afinidad es una técnica cromatográfica que se basa en interacciones altamente específicas, como, por ejemplo, entre un receptor y ligando, un antígeno y anticuerpo, o una enzima y sustrato. Como sabrá un experto en la técnica, las moléculas selectivas empleadas en un paso de cromatografía de afinidad en los métodos de purificación descritos en la presente pueden basarse en varias propiedades (por ejemplo, estructura tridimensional, glicosilación, etc.) de ASA producida recombinantemente que pueden ser explotadas por la molécula selectiva. Las moléculas selectivas ejemplares (o reactivos de captura) que pueden utilizarse en un paso de cromatografía de afinidad incluyen proteína A, proteína G, un anticuerpo, un ion metálico (por ejemplo, níquel), sustrato específico, ligando o antígeno. En algunas realizaciones, una molécula selectiva adecuada para un paso de cromatografía de afinidad de la presente invención utiliza un anticuerpo anti-Arilsulfatasa A (por ejemplo, un anticuerpo anti-Arilsulfatasa A humana). Los anticuerpos anti-arilsulfatasa A adecuados pueden obtenerse comercialmente o mediante inmunización de animales no humanos (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, pollo, cabra, oveja, caballo u otro animal adecuado para producir anticuerpos contra una proteína humana).

20 En general, una molécula de interés (por ejemplo, ASA recombinante) queda atrapada en una fase o medio sólido o estacionario mediante la interacción con una molécula selectiva, mientras que otras moléculas no deseadas no quedan atrapadas ya que no están unidas por las moléculas selectivas. El medio sólido puede entonces eliminarse de la mezcla, opcionalmente lavarse, y la molécula de interés liberarse del atrapamiento por elución. En algunas realizaciones, las columnas de afinidad pueden eluirse cambiando la fuerza iónica a través de un gradiente. Por ejemplo, pueden usarse las concentraciones de sal, pH, pI y fuerza iónica para separar o formar el gradiente a separar.

30 En algunas realizaciones, puede producirse una proteína ASA recombinante con un marcador para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Como sabrá un experto en la técnica, los marcadores de proteínas pueden incluir, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), hexahistidina (His), proteína de unión a maltosa (MBP), entre otros. En algunas realizaciones, se usan lectinas en cromatografía de afinidad para separar componentes dentro de la muestra. Por ejemplo, ciertas lectinas se unen específicamente a una molécula de carbohidrato particular y pueden usarse para separar las glicoproteínas de las proteínas no glicosiladas, o una glicofoma de otra glicofoma.

Cromatografía de intercambio iónico

40 Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico).

45 Como sabrá un experto en la técnica, los intercambiadores de iones (por ejemplo, intercambiadores aniónicos y/o intercambiadores catiónicos) pueden basarse en varios materiales con respecto a la matriz, así como a los grupos cargados unidos. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes matrices, en las cuales los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: a base de agarosa (como SEPHAROSE™ CL-6B, SEPHAROSE™ Fast Flow y SEPHAROSE™ High Performance), a base de celulosa (como DEAE SEPHACEL®), a base de dextrano (como SEPHADEX®), a base de sílice y a base de polímero sintético.

50 La resina de intercambio iónico puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos. Típicamente, un tampón de equilibrio, que permite que la resina se una a sus contraiones, puede pasarse a través de la resina de intercambio iónico antes de cargar la muestra o composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes en la resina. Convenientemente, el tampón de equilibrio puede ser el mismo que el tampón de carga, pero esto no es necesario.

55 En una realización opcional de la invención, la resina de intercambio iónico puede regenerarse con un tampón de regeneración después de la elución del polipéptido, de tal manera que la columna pueda reutilizarse. Generalmente, la concentración de sal y/o pH del tampón de regeneración puede ser tal que sustancialmente todos los contaminantes y el polipéptido de interés se eluyan de la resina de intercambio iónico. Generalmente, el tampón de regeneración tiene una concentración de sal muy alta para eluir contaminantes y el polipéptido de la resina de intercambio iónico.

Cromatografía de intercambio aniónico

65 Las realizaciones de la invención incluyen, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante), y someter la muestra a cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo,

la cromatografía de intercambio aniónico descrita en la presente. Para la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que están unidos covalentemente a la matriz pueden ser, por ejemplo, dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). En algunas realizaciones, la resina de intercambio aniónico empleada es una columna Q Sepharose. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse usando, por ejemplo, Q SEPHAROSE™ Fast Flow, Q SEPHAROSE™ High Performance, Q SEPHAROSE™ XL, CAPTO™ Q, DEAE, TOYOPEARL GIGACAP® Q, FRACTOGEL® TMAE (trimetilaminoetilo, una resina de amoniaco cuaternario), ESHMUNO™ Q, NUVIA™ Q o UNOSPHERE™ Q. Pueden usarse otros intercambiadores aniónicos dentro del alcance de la invención incluyendo, pero no limitados a, resinas de amina cuaternaria o "resinas Q" (por ejemplo, CAPTO™-Q, Q-SEPHAROSE®, QAE SEPHADEX®); resinas de dietilaminoetano (DEAE) (por ejemplo, DEAE-TRISACRYL®, DEAE SEPHAROSE®, DEAE naftoilada benzoilada, dietilaminoetil SEPHACEL®); resinas AMBERJET®; resinas AMBERLYST®; resinas AMBERLITE® (por ejemplo, AMBERLITE® IRA-67, AMBERLITE® fuertemente básica, AMBERLITE® débilmente básica), resina de colestiramina, resinas ProPac® (por ejemplo, PROPAC® SAX-10, PROPAC® WAX-10, PROPAC® WCX-10); resinas TSK-GEL® (por ejemplo, TSKgel DEAE-NPR; TSKgel DEAE-5PW); y resinas ACCLAIM®. En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio aniónico se realiza a una temperatura de aproximadamente 23° C o menos, aproximadamente 18° C o menos, o aproximadamente 16° C o menos, por ejemplo, aproximadamente 23° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 18° C, o aproximadamente 16° C.

Las fases móviles típicas para la cromatografía de intercambio aniónico incluyen soluciones relativamente polares como agua, acetonitrilo, alcoholes orgánicos como metanol, etanol e isopropanol, o soluciones que contienen ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES). Por tanto, en ciertas realizaciones, la fase móvil incluye aproximadamente un 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% o aproximadamente un 100% de solución polar. En ciertas realizaciones, la fase móvil comprende entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 100%, aproximadamente un 5% y aproximadamente un 95%, aproximadamente un 10% y aproximadamente un 90%, aproximadamente un 20% y aproximadamente un 80%, aproximadamente un 30% y aproximadamente un 70%, o aproximadamente un 40% y aproximadamente un 60% de solución polar en cualquier momento dado durante el curso de la separación.

En ciertas realizaciones, la rASA se carga a una capacidad de unión de aproximadamente 23 AU/l de resina o menos, por ejemplo, aproximadamente 19 AU/l de resina o menos, aproximadamente 15 AU/l de resina o menos, o aproximadamente 12 AU/l de resina o menos, por ejemplo, entre aproximadamente 12 AU/l de resina y aproximadamente 15 AU/l de resina, o entre aproximadamente 15 AU/l de resina y aproximadamente 19 AU/l de resina. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía de intercambio aniónico con una capacidad de unión de por lo menos aproximadamente 4,5 g/l de resina (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 5 g/l de resina, 6 g/l de resina, 7 g/l de resina, 8 g/l de resina, 9 g/l de resina, 10 g/l de resina, 11 g/l de resina, 12 g/l de resina, 13 g/l de resina, 14 g/l de resina, o 15 g/l de resina). En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía de intercambio aniónico con una capacidad de unión que varía entre aproximadamente 4,5-20 g/l de resina (por ejemplo, que varía entre aproximadamente 5-20 g/l de resina; 5-19 g/l de resina, 5-18 g/l de resina, 5-17 g/l de resina, 5-16 g/l de resina, 5-15 g/l de resina, 7,5-20 g/l de resina, 7,5-19 g/l de resina, 7,5-18 g/l de resina, 7,5-17 g/l de resina, 7,5-16 g/l de resina, 7,5-15 g/l de resina, 10-20 g/l de resina, 10-19 g/l de resina, 10-18 g/l de resina, 10-17 g/l de resina, 10-16 g/l de resina, o 10-15 g/l de resina).

La solución acuosa que comprende la ASA y los contaminantes puede cargarse en la resina aniónica como una fase móvil usando un tampón de carga que tiene una concentración de sal y/o un pH tal que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio aniónico. La resina puede lavarse luego con uno o más volúmenes de columna de tampón de carga seguido por uno o más volúmenes de columna de tampón de lavado en donde se incrementa la concentración de sal. Finalmente, la ASA puede eluirse mediante un tampón de elución de concentración salina creciente. Opcionalmente, la elución de la enzima también puede estar mediada por una disminución gradual o escalonada del pH. Las fracciones que contienen actividad de ASA pueden recogerse y combinarse para una purificación adicional.

En algunas realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza con un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga no contiene cloruro de sodio. En otra realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal en la fase móvil es un gradiente (por ejemplo, gradiente lineal o no lineal). En algunas realizaciones, la concentración de sal en la fase móvil es constante. En algunas realizaciones, la concentración de sal en la fase móvil puede aumentar o disminuir escalonadamente. En algunas realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7.

En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de intercambio aniónico puede incluir dos o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, cada uno usando un tampón de lavado diferente. En una realización, el tampón de lavado no contiene cloruro de sodio. En otra realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de lavado es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, por ejemplo, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM, por ejemplo, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 120 mM o aproximadamente 140 mM. En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7.

En una realización, el tampón de elución contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, la concentración de fosfato de sodio del tampón de elución es de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, por ejemplo, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 45 mM, por ejemplo, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM o aproximadamente 40 mM. En otra realización, el tampón de elución no contiene cloruro de sodio. En otra realización más, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de elución es de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, por ejemplo, de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 280 mM. En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7.

En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio aniónico incluye uno o más pasos de recogida del pico de elución. Por ejemplo, la recogida del pico de elución comienza de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente hasta aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente hasta aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 200 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 200 mAU en el lado descendente, o de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, como se determina por espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nM.

Es evidente para el experto en la técnica que pueden usarse numerosos tampones diferentes en los pasos de carga, lavado y elución. Típicamente, sin embargo, la columna puede equilibrarse con 1-10 lavados de columna de un tampón que comprende MES-Tris 0,05 M, pH 7,0. Por conveniencia, la muestra puede cargarse en el tampón del paso anterior del proceso de purificación, o la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. La columna puede lavarse con 1-10 volúmenes de columna del tampón usado para el equilibrio, seguido de un tampón de lavado que comprende MES-Tris 0,02M, NaCl 0,12M, pH 7,0. Alternativamente, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualquier otro tampón de equilibrio, carga y lavado descrito en la presente para la cromatografía de intercambio aniónico. La muestra puede eluirse en un tampón que comprende MES-Tris 0,02M, NaCl 0,26M, pH 7,0. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en la presente para cromatografía de intercambio aniónico.

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución descritos en la presente pueden incluir uno o más agentes de tamponamiento. Por ejemplo, el agente de tamponamiento puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio o una combinación de los mismos. La concentración del agente de tamponamiento está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 500 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y 5 mM, entre aproximadamente 5 mM y 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y 50 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM.

El rendimiento, la actividad y la pureza después de la cromatografía de intercambio aniónico pueden variar. En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es por lo menos de aproximadamente de 75%, por ejemplo, por lo menos de aproximadamente el 85%, por ejemplo, entre aproximadamente el 85% y aproximadamente el 99%, o entre aproximadamente el 90% y aproximadamente el 99%. En algunas realizaciones, el rendimiento de proteína (UA o Unidades de Absorbancia) es de aproximadamente del 10% al 50%, por ejemplo, de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 35%, o de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 30%, por ejemplo, como se determina por espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm. En algunas realizaciones (por ejemplo, las que usan una columna TMAE como se describe a continuación), el rendimiento de la actividad de la proteína de la agrupación de elución (UA o unidades de absorción) es de aproximadamente el 70% al 400%, por ejemplo, de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 390%, o de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 350%, o de aproximadamente el 100% al 150%, mayor que por lo menos un 95%, por ejemplo, como se determina por espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm. En algunas realizaciones (por ejemplo, aquellas

que usan una columna TMAE como se describe a continuación), el valor de reducción logarítmica (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,1, por ejemplo., entre aproximadamente 0,6 y 0,9, o entre aproximadamente 0,7 y 0,8. En algunas realizaciones (por ejemplo, aquellas que usan una columna TMAE como se describe a continuación), la pureza es de por lo menos el 75%, por ejemplo, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90% o más, como se determina mediante, por ejemplo, electroforesis capilar-SDS PAGE. En realizaciones preferidas, el rendimiento de la actividad, el HCP LRV y la pureza (como se determina por electroforesis capilar-SDS PAGE) después de la cromatografía de intercambio aniónico son por lo menos aproximadamente del 90%, por lo menos aproximadamente 0,6 y por lo menos aproximadamente del 80%, respectivamente.

En realizaciones preferidas de la invención, se usa una columna de intercambio aniónico con una alta capacidad de carga. En ciertas realizaciones de la invención, la columna se caracteriza por un intervalo de carga entre aproximadamente 3-20 g/l (es decir, aproximadamente 5-15 g/l, aproximadamente 10-15 g/l, aproximadamente 10-20 g/l). En algunas realizaciones, la capacidad de carga es significativamente mayor de 4,3 g/l (por ejemplo, es o es mayor de aproximadamente 10 g/l, 12,5 g/l, 15 g/l, 17,5 g/l o 20 g/l). En ciertas realizaciones, la capacidad de unión de la resina está entre aproximadamente 75-100 AU/l (por ejemplo, aproximadamente 75 AU/l, aproximadamente 80 AU/l, aproximadamente 85 AU/l, aproximadamente 90 AU/l, aproximadamente 95 AU/l). En ciertas realizaciones, la capacidad de carga es mayor de aproximadamente 80 AU/l. En algunas realizaciones, la columna de alta capacidad de carga es una columna TMAE. En realizaciones particulares, la columna se selecciona del grupo que consiste de una columna Fractogel® TMAE, una columna Nuvia Q, una columna Q Sepharose Fast Flow, una columna Capto Q, una columna Q Sepharose XL, una columna Eshumuno Q, una columna UNOsphere Q, o una columna GigaCap Q.

En realizaciones particulares de la invención, una columna TMAE se equilibra previamente con un tampón que comprende aproximadamente MES-Tris 20 mM y NaCl 1000 mM a un pH de 7,0. En ciertas realizaciones, la columna se equilibra con un tampón que comprende MES-Tris 50 mM a un pH de 7,0. En algunas realizaciones, el caudal de carga de la columna TMAE es de aproximadamente 75-125 cm/h (es decir, aproximadamente 75-115 cm/h, aproximadamente 75-110 cm/h, aproximadamente 75-105 cm/h, aproximadamente 75-100 cm/h, aproximadamente 85-115 cm/h, aproximadamente 85-110 cm/h, aproximadamente 85-105 cm/h, aproximadamente 85-100 cm/h, aproximadamente 95-115 cm/h, aproximadamente 95-110 cm/h, aproximadamente 95-105 cm/h, aproximadamente 95-100 cm/h, aproximadamente 100-120 cm/h, aproximadamente 100-115 cm/h, aproximadamente 100-110 cm/h, aproximadamente 100 cm/h). Las condiciones de carga pueden optimizarse y evaluarse mediante la absorbancia A280 como se describe en la presente.

En realizaciones particulares que utilizan una columna TMAE (por ejemplo, una columna TMAE Fractogel), se pierde muy poco producto en el flujo durante la carga, incluso a capacidades de carga superiores a 15 g/l. La capacidad de aumentar la capacidad de carga mientras se minimiza la pérdida de flujo es una mejora significativa en la metodología de purificación. En realizaciones particulares de la invención, la cantidad de pérdida de producto a través del flujo es inferior al 30% de la carga (por ejemplo, inferior al 25%, inferior al 20%, inferior al 15%, inferior al 10% o inferior a aproximadamente el 5%).

Después de la carga, en algunas realizaciones, una columna TMAE se lava por lo menos una vez. En realizaciones particulares, la columna se lava dos veces. Un primer o segundo tampón de lavado puede comprender un nivel optimizado de cloruro de sodio. En algunas realizaciones, la cantidad de cloruro de sodio es un primer o segundo tampón de lavado entre aproximadamente 50-150 mM (por ejemplo, aproximadamente 50-140 mM, aproximadamente 50-130 mM, aproximadamente 50-120 mM, aproximadamente 50-110 mM, aproximadamente 50-100 mM, aproximadamente 50-90 mM, aproximadamente 50-80 mM, aproximadamente 80-150 mM, aproximadamente 80-140 mM, aproximadamente 80-130 mM, aproximadamente 80-120 mM, aproximadamente 80-110 mM, aproximadamente 80-100 mM, aproximadamente 80-90 mM, aproximadamente 80 mM o aproximadamente 120 mM). En algunas realizaciones, un primer tampón de lavado comprende MES-Tris 50 mM a pH 7,0. En algunas realizaciones, un segundo tampón de lavado comprende, MES-Tris 20 mM, NaCl 100 mM a pH 7,0. La optimización adicional de las condiciones de lavado, particularmente las segundas condiciones de lavado, está abarcada dentro de las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, aumentar la concentración de sal de un segundo lavado puede mejorar los valores de reducción logarítmica (LRV) de la proteína de célula huésped (HCP) y la pureza general, pero disminuye tanto la actividad como el rendimiento de A280. Como se describe en la presente, las condiciones de lavado particulares deben equilibrarse con las condiciones de elución descritas a continuación para proporcionar la combinación óptima de pureza, actividad y rendimiento.

En realizaciones de la invención, la ASA recombinante unida a una columna TMAE se eluye con un tampón de elución. En alguna realización, se optimiza la cantidad de cloruro de sodio en el tampón de elución. En realizaciones particulares, la cantidad de cloruro de sodio en el tampón de elución está entre aproximadamente 150-300 mM (por ejemplo, aproximadamente 150-290 mM, aproximadamente 150-280 mM, aproximadamente 150-270 mM, aproximadamente 150-260 mM, aproximadamente 150-250 mM, aproximadamente 150-240 mM, aproximadamente 150-230 mM, aproximadamente 150-220 mM, aproximadamente 150-210 mM, aproximadamente 170-290 mM, aproximadamente 170-280 mM, aproximadamente 170-270 mM, aproximadamente 170-260 mM,

aproximadamente 170-250 mM, aproximadamente 170-240 mM, aproximadamente 170-230 mM, aproximadamente 170-220 mM, aproximadamente 170-210 mM aproximadamente 180-290 mM, aproximadamente 180-280 mM, aproximadamente 180-270 mM, aproximadamente 180-260 mM, aproximadamente 180-250 mM, aproximadamente 180-240 mM, aproximadamente 180-230 mM, aproximadamente 180-220 mM, aproximadamente 180-210 mM, aproximadamente 180, aproximadamente 220 o aproximadamente 260). En un ejemplo particular, el tampón de elución comprende MES-Tris 50 mM y NaCl 1 M a un pH de 7,0. En algunas realizaciones, el rendimiento de A280 después de la elución es mayor del 60% de la carga (por ejemplo, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80% o más). La optimización adicional de las condiciones de elución está abarcada dentro de las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, aumentar la concentración de sal de elución (es decir, conductividad) proporciona un mejor rendimiento pero da como resultado una pureza y eliminación de HCP más pobres. Y como se ha indicado anteriormente, las condiciones particulares de lavado deben equilibrarse con las condiciones de elución para proporcionar la combinación óptima de pureza, actividad y rendimiento.

Cromatografía de intercambio catiónico

En algunas realizaciones, el método incluye además someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo (SP), por ejemplo, como se describe en la presente. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a cromatografía de intercambio aniónico antes de la cromatografía de intercambio catiónico. En una realización típica, la cromatografía de intercambio catiónico comprende cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo (SP), pero pueden usarse otras membranas o resinas de cromatografía de catión, por ejemplo, una membrana MUSTANG™ S, una resina S-SEPHAROSE™ o una resina Blue SEPHAROSE™. En algunas realizaciones, el método comprende además concentrar y/o filtrar la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o diafiltración, por ejemplo, mediante ultrafiltración de flujo tangencial. La cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse a una temperatura optimizada, por ejemplo, como se describe en la presente, para mejorar la unión al objetivo y/o disminuir la unión a impurezas. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 23° C, 18° C, 16° C o menos.

En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo (SP). En otra realización, la cromatografía de intercambio catiónico es un paso de depuración. La cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo (SP)) puede realizarse, por ejemplo, con uno o más de: TOYOPEARL® SP-650, TOYOPEARL® SP-550, TSKGEL® SP-3PW, TSKGEL® SP-5PW, SP SEPHAROSE™ Fast Flow, SP SEPHAROSE™ High Performance, SP SEPHAROSE™ XL, membrana SARTOBIND® S, POROS® HS50, UNOSPHERE™ S y MACROCAP™ S.

La solución acuosa que comprende la arilsulfatasa A y los contaminantes puede cargarse en la resina catiónica usando un tampón de carga que tiene una concentración de sal y/o un pH tal que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio catiónico. La resina puede lavarse luego con uno o más volúmenes de columna de tampón de equilibrio o tampón de carga, y opcionalmente seguido por uno o más volúmenes de columna de tampón de lavado en donde se aumenta la concentración de sal. Finalmente, la arilsulfatasa A puede eluirse en un tampón de elución. Las fracciones que contienen actividad de arilsulfatasa A pueden recogerse y combinarse para una purificación adicional.

En una realización típica, la concentración de NaCl y/o el pH del tampón de carga, el tampón de lavado y/o el tampón de elución pueden optimizarse, por ejemplo, como se describe en la presente, para mejorar la unión al objetivo y/o disminuir la unión a impurezas. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de carga es de aproximadamente 20 mM, 15 mM, 10 mM o menos. En algunas realizaciones, el tampón de carga tiene un pH de aproximadamente 4,5, 4,3, 4,0 o menos. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de lavado es de aproximadamente 20 mM, 15 mM, 10 mM o menos. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de elución es de aproximadamente 55 mM, 50 mM, 45 mM, 40 mM o menos.

En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de cromatografía catiónica (por ejemplo, una columna de intercambio catiónico de sulfopropilo (SP)), lavar la columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir la arilsulfatasa A de la columna. En algunas realizaciones, las columnas pueden equilibrarse con más de 3, por ejemplo, de 5 a 10 volúmenes de columna de NaAc 0,01 M, NaCl 0,01 M, ácido acético 0,03 M, pH 4,2.

En algunas realizaciones, la muestra puede cargarse en el tampón del paso anterior del proceso de purificación, o la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, por ejemplo de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM o aproximadamente 20 mM. En otra realización, el tampón de carga contiene acetato de sodio. Por ejemplo, la concentración de acetato de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 60 mM. En algunas

realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,0, por ejemplo, de aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0, por ejemplo, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,3 o aproximadamente 4,5. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía de intercambio catiónico con una capacidad de unión de aproximadamente 15 UA/l de resina o menos, por ejemplo, de aproximadamente 14 AU/l de resina o menos, o de aproximadamente 12 AU/l de resina o menos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 AU/l de resina y aproximadamente 14 AU/l de resina, o entre aproximadamente 10 AU/l de resina y aproximadamente 12 AU/l de resina.

En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de intercambio catiónico puede incluir dos o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, cada uno usando un tampón de lavado diferente. La columna se puede lavar con 1-10 volúmenes de columna del tampón usado para el equilibrio. Alternativamente, la columna se puede equilibrar, cargar y lavar con cualquier otro tampón de equilibrio, carga y lavado descrito en la presente para la cromatografía de intercambio catiónico. En una realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de lavado es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 15 mM, por ejemplo, de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM o aproximadamente 20 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene acetato de sodio. Por ejemplo, la concentración de acetato de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 40 mM o aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,0, por ejemplo, de aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0, por ejemplo, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,3 o aproximadamente 4,5.

En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un tampón de elución. En una realización, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de elución es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, por ejemplo, de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 60 mM, por ejemplo, de aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM o aproximadamente 55 mM. En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,0, por ejemplo, de aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0, por ejemplo, de aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,3 o aproximadamente 4,5. Así, como un ejemplo particular, la muestra puede eluirse en un tampón que comprende NaAc 0,02 M, NaCl 0,05 M, pH 4,5. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en la presente para la cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico incluye uno o más pasos de recogida del pico de elución. Por ejemplo, la recogida del pico de elución comienza de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 200 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 200 mAU en el lado descendente, o de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm. Los picos de eluato recogidos pueden agruparse.

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución descritos en la presente pueden incluir uno o más agentes de tamponamiento. Por ejemplo, el agente de tamponamiento puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio o una combinación de los mismos. La concentración del agente de tamponamiento está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 500 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y 5 mM, entre aproximadamente 5 mM y 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y 50 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una temperatura de aproximadamente 23° C o menos, aproximadamente 18° C o menos, o aproximadamente 16° C o menos, por ejemplo, aproximadamente 23° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 18° C o aproximadamente 16° C. En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza entre aproximadamente 23° C y aproximadamente 16° C, por ejemplo, a aproximadamente 23° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 18° C o aproximadamente 16° C, y la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH entre

aproximadamente 4,5 y aproximadamente 4,3, por ejemplo, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,3. En algunas realizaciones, se somete la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico a aproximadamente 23°C y se carga la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico a un pH de aproximadamente 4,5. En algunas realizaciones, se somete la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico a aproximadamente 23°C y se carga la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico a un pH de aproximadamente 4,3. En algunas realizaciones, se somete la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico a aproximadamente 18°C y se carga la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico a un pH de aproximadamente 4,5. En algunas realizaciones,

El rendimiento después de la cromatografía de intercambio catiónico puede variar. En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es por lo menos de aproximadamente el 75%, por ejemplo, por lo menos de aproximadamente el 80%, por ejemplo, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 105%. En algunas realizaciones, el rendimiento de proteína (UA o Unidades de Absorbancia) es de aproximadamente el 65% al 100%, por ejemplo, de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 95%, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

La pureza y la actividad después de la cromatografía de intercambio catiónico se mejora considerablemente. En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) está entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,5, por ejemplo, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,0 o entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 1,9. La actividad específica de la arilsulfatasa A purificada puede ser por lo menos de aproximadamente 50 U/mg a aproximadamente 140 U/mg, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 70 U/mg, por lo menos aproximadamente 90 U/mg, por lo menos aproximadamente 100 U/mg, o por lo menos aproximadamente 120 U/mg, por ejemplo, como se determina mediante un método descrito en la presente. En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica a por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 98%, por lo menos aproximadamente el 99%, por lo menos aproximadamente el 99,5%, por lo menos aproximadamente el 99,6%, por lo menos aproximadamente el 99,7%, por lo menos aproximadamente el 99,8 %, o por lo menos aproximadamente el 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de: transferencia Western de proteína de la célula huésped (HCP), tinción con Coomassie SDS-PAGE, tinción con plata SDS-PAGE, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión por tamaño. En ciertas realizaciones, la disminución de la concentración de sal del tampón de carga y la disminución de su pH aumenta la unión de ASA a la columna de intercambio catiónico pero no afecta la unión a impurezas. En otras palabras, un equilibrio óptimo de concentración de sal y pH, como se ha establecido anteriormente, puede aumentar el rendimiento después de la cromatografía de intercambio catiónico sin afectar negativamente a la pureza.

En algunas realizaciones, puede ajustarse el pH de una agrupación de eluato de intercambio catiónico. En ciertas realizaciones, el pH se ajusta inmediatamente antes de la filtración viral. El eluato de intercambio catiónico (por ejemplo, eluato SP) puede ajustarse a un pH de aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5 o aproximadamente 7,0 usando un tampón de ajuste de pH que comprende fosfato de sodio 0,25 M, cloruro de sodio 1,33 M, citrato de sodio 0,34 M, pH 7,0. En ciertas realizaciones, la agrupación de eluato SP ajustado con pH se filtra viralmente en un filtro Planova 20N. En algunas realizaciones, el rendimiento relativo a la entrada después de la filtración viral del eluato de intercambio catiónico ajustado por pH está entre aproximadamente el 90-100%; es decir, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más, como se evalúa mediante absorbancia A280. El rendimiento para la filtración viral es significativo ya que verifica que el ajuste de pH a aproximadamente 6,0 permite que los octámeros de ASA (que tienen aproximadamente 20 nm de diámetro) se disocien de manera dimérica. Por tanto, el tamaño de poro de un filtro viral puede seleccionarse para garantizar que solo se filtre la forma dimérica (es decir, que la forma octamérica pueda ser retenida por el filtro o provocar la obstrucción del filtro viral). Por ejemplo, un filtro viral con un tamaño de poro de 20 nm retendrá la forma octamérica de ASA, pero no la forma dimérica.

Cromatografía de modo mixto

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir uno o más pasos de cromatografía de modo mixto. La cromatografía de modo mixto es un tipo de cromatografía en la que se aplican varios modos de separación para resolver una mezcla de diferentes moléculas, típicamente en cromatografía líquida. Por ejemplo, una separación en modo mixto puede incluir fases combinacionales con características de intercambio iónico y de fase inversa al mismo tiempo. Estas fases estacionarias con más de un tipo de interacción están disponibles de varios fabricantes de columnas.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para purificar arilsulfatasa A de una muestra, donde el método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante) y someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de modo mixto, por ejemplo la cromatografía de modo mixto descrita en la presente, como un método que incluye cromatografía de hidroxiapatita cerámica (HA), por ejemplo,

cromatografía de hidroxiapatita tipo I o tipo II. En algunas realizaciones, la cromatografía de modo mixto se realiza usando uno o más de: medios de hidroxiapatita cerámica CHT™ tipo I, medios de hidroxiapatita cerámica CHT™ tipo II, hidroxiapatita BIO-GEL® HT e hidroxiapatita BIO-GEL® HTP.

5 En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de modo mixto incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, cromatografía de HA), lavar la columna de cromatografía de modo mixto y eluir la arilsulfatasa A de la columna. En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio de modo mixto se realiza a una temperatura de aproximadamente 23° C o menos, aproximadamente 18° C o menos, o aproximadamente 16° C o menos, por ejemplo, aproximadamente 23° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 18° C o aproximadamente 16° C.

15 En algunas realizaciones, cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de modo mixto se realiza con un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, la concentración de fosfato de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, o aproximadamente 5 mM. En otra realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, por ejemplo, de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 mM, por ejemplo, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 260 mM o aproximadamente 280 mM.

25 En algunas realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de modo mixto se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7.

30 En algunas realizaciones, la cromatografía de modo mixto incluye cromatografía de hidroxiapatita cerámica (HA). La hidroxiapatita (HAP) se refiere habitualmente a la forma cristalina del fosfato de calcio. El mecanismo de la HAP implica interacciones no específicas entre grupos carboxilo de proteínas cargados negativamente e iones de calcio cargados positivamente en la resina, y grupos amino de proteínas cargados positivamente e iones de fosfato cargados negativamente en la resina. Las proteínas básicas o ácidas pueden adsorberse selectivamente en la columna ajustando el pH del tampón; la elución puede lograrse variando la concentración de sal del tampón. De nuevo, es evidente que pueden emplearse numerosas composiciones de tampón, así como combinaciones de tampones. Típicamente, sin embargo, la columna puede equilibrarse con 1-10 lavados de la columna de un tampón que comprende NaPO₄ 0,001 M, MES-Tris 0,02 M, NaCl 0,26 M, pH 7,0. Por conveniencia, la muestra puede cargarse en el tampón del paso anterior del proceso de purificación, o la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. La columna puede lavarse con 1-10 volúmenes de columna del tampón usado para el equilibrio, seguido de un lavado de tampón que comprende NaPO₄ 0,005 M, MES-Tris 0,02 M, NaCl 0,26 M, pH 7,0. Alternativamente, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualquier otro tampón de equilibrio, carga y lavado descrito en la presente para cromatografía de modo mixto. La muestra puede eluirse en un tampón que comprende NaPO₄ 0,04 M, pH 7,0. Opcionalmente, la columna puede eliminarse lavando con 1-10 volúmenes de columna de NaPO₄ 0,4 M, pH 12. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en la presente para cromatografía de modo mixto.

45 En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de modo mixto se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de cromatografía de modo mixto puede incluir dos o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, cada uno con un tampón de lavado diferente.

50 En una realización, el tampón de lavado contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, la concentración de fosfato de sodio del tampón de lavado es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM o aproximadamente 10 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de lavado es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 600 mM, por ejemplo, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mM, por ejemplo, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 260 mM, o aproximadamente 280 mM.

60 En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de modo mixto se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7.

65 En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de modo mixto se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7. En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de modo mixto incluye uno o más pasos de recogida del pico de elución. Por ejemplo, la

recogida del pico de elución comienza desde aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente hasta aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 200 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 200 mAU en el lado descendente, o de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución descritos en la presente pueden incluir uno o más agentes de tamponamiento. Por ejemplo, el agente tampón puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio o una combinación de los mismos. La concentración del agente tampón está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 500 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y 5 mM, entre aproximadamente 5 mM y 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y 50 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, la purificación de ASA por cromatografía de modo mixto sucede a la purificación por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico). Sin embargo, se contempla que estos pasos podrían realizarse en el orden inverso.

El rendimiento después de la cromatografía de modo mixto puede variar. En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad arilsulfatasa A es de por lo menos aproximadamente el 80%, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 90%, por ejemplo, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 115%. En algunas realizaciones, el rendimiento de proteína (UA o Unidades de Absorbancia) es de aproximadamente el 30% al 80%, por ejemplo, de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 75%, o de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 70%, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

La pureza después de la cromatografía de modo mixto se mejora enormemente. En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es por lo menos de aproximadamente 50 U/mg a aproximadamente 140 U/mg, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 70 U/mg, por lo menos aproximadamente 90 U/mg, por lo menos aproximadamente 100 U/mg, o por lo menos aproximadamente 120 U/mg, por ejemplo, como se determina mediante un método descrito en la presente. En alguna realización, la arilsulfatasa A se purifica a por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 98%, por lo menos aproximadamente el 99%, por lo menos aproximadamente el 99,5%, por lo menos aproximadamente el 99,6%, por lo menos aproximadamente el 99,7%, por lo menos aproximadamente el 99,8 %, o por lo menos aproximadamente el 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de: transferencia Western de proteína de la célula huésped (HCP), tinción con Coomassie SDS-PAGE, tinción con plata SDS-PAGE, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) está entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,6, por ejemplo, entre aproximadamente 0,4 y 0,5.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En una realización, la cromatografía de interacción hidrófoba incluye cromatografía de fenilo. En otras realizaciones, la cromatografía de interacción hidrófoba incluye cromatografía de butilo o cromatografía de octilo. En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a HIC se realiza a una temperatura de aproximadamente 23° C o menos, aproximadamente 18° C o menos, o aproximadamente 16° C o menos, por ejemplo, aproximadamente 23° C, aproximadamente 20° C, aproximadamente 18° C, o aproximadamente 16° C. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a cromatografía de modo mixto antes de la HIC.

La cromatografía de interacción hidrófoba utiliza la atracción de una molécula dada para un entorno polar o no polar, y en términos de proteína, esta propensión se rige por la hidrofobicidad o hidrofilicidad de los residuos en la superficie exterior expuesta de una proteína. Por tanto, las proteínas se fraccionan en base a sus varios grados de atracción hacia una matriz hidrófoba, típicamente un soporte inerte con brazos conectores de alquilo de 2-18 carbonos en la longitud de la cadena. La fase estacionaria consiste de pequeños grupos no polares (butilo, octilo o fenilo) unidos a una estructura principal de polímero hidrófilo (por ejemplo., Sepharose™ reticulado, dextrano o agarosa). Por tanto, la columna de HIC es típicamente una columna SEPHAROSE™ de butilo o una columna SEPHAROSE™ de fenilo, más típicamente una columna SEPHAROSE™ de fenilo. En algunas realizaciones, la cromatografía de interacción hidrófoba incluye cromatografía de fenilo usando uno o más de SEPHAROSE™ High Performance de fenilo, SEPHAROSE™ 6 Fast Flow de fenilo (sub bajo) o SEPHAROSE™ 6 Fast Flow de fenilo (sub

alto).

En algunas realizaciones, someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de interacción hidrófoba incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de HIC, lavar la columna de HIC y eluir la arilsulfatasa A de la columna. La carga, el lavado y la elución en HIC básicamente siguen el mismo principio descrito anteriormente para la cromatografía de intercambio iónico, pero a menudo se aplican condiciones casi opuestas a las usadas en la cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, el proceso de HIC implica el uso de un tampón de carga de sal alta, que desentraña la proteína para exponer sitios hidrófobos. La proteína es retenida por los ligandos hidrófobos en la columna y se expone a un gradiente de tampones que contienen concentraciones de sal decrecientes. A medida que disminuye la concentración de sal, la proteína vuelve a su conformación nativa y finalmente se eluye de la columna. Alternativamente, las proteínas pueden eluirse con PEG.

En algunas realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de HIC se realiza con un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 2,5 M, por ejemplo, aproximadamente 1 M o aproximadamente 1,5 M. En otra realización, el tampón de carga contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, la concentración de fosfato de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM o aproximadamente 75 mM. En algunas realizaciones, la carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de HIC se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, por ejemplo, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0 o aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de HIC con una capacidad de unión de aproximadamente 12 AU/I de resina o menos, por ejemplo, aproximadamente 10 AU/I de resina o menos, aproximadamente 9 AU/I de resina o menos, aproximadamente 7 AU/I de resina o menos, o aproximadamente 5 AU/I de resina o menos, por ejemplo, entre aproximadamente 5 AU/I de resina y aproximadamente 9 AU/I de resina, o entre aproximadamente 5 AU/I de resina y aproximadamente 7 AU/I de resina.

El uso de SEPHAROSE™ de fenilo como fase sólida en el HIC es típico en la presente divulgación. De nuevo, es evidente que, cuando se trata de las condiciones exactas, así como de los tampones y las combinaciones de tampones usados para los procesos de carga, lavado y elución, hay un gran número de posibilidades diferentes. En una realización típica, la columna puede equilibrarse en un tampón que contiene NaPO₄ 0,05 M, NaCl 1 M, pH 5,5. Por conveniencia, la muestra puede cargarse en el tampón del paso anterior del proceso de purificación, o la muestra puede cargarse usando un tampón de carga.

En algunas realizaciones, el lavado de la columna de HIC se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de HIC puede incluir dos o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, cada uno usando un tampón de lavado diferente. En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de lavado es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1,5 M, por ejemplo, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 750 mM o aproximadamente 1 M. En otra realización, el tampón de lavado contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, la concentración de fosfato de sodio del tampón de carga es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 75 mM. En algunas realizaciones, el lavado de la columna de HIC se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, por ejemplo, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0 o aproximadamente 6,5. Por ejemplo, el lavado puede realizarse usando 1-2 lavados de la columna de tampón de equilibrio seguido de 1-5 volúmenes de columna de MES 0,02 M, NaPO₄ 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 5,5. Alternativamente, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualquier otro tampón de equilibrio, carga y lavado descrito en la presente para HIC.

En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de HIC se realiza con un tampón de elución. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio del tampón de elución es de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 85 mM, por ejemplo, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM o aproximadamente 80 mM. En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de HIC se realiza a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 7. Por ejemplo, la arilsulfatasa A puede eluirse usando MES-Tris 0,02 M, NaCl 0,06 M, pH 7,0. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en la presente para HIC.

En algunas realizaciones, la elución de la arilsulfatasa A de la columna de HIC incluye uno o más pasos de recogida del pico de elución. Por ejemplo, la recogida del pico de elución comienza de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 200 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 50 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado

ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, de aproximadamente 50 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 200 mAU en el lado descendente, o de aproximadamente 100 mAU en el lado ascendente a aproximadamente 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

En algunas realizaciones, la purificación de arilsulfatasa A por HIC sucede a la purificación por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico) y/o cromatografía de modo mixto. Sin embargo, se contempla que estos pasos podrían realizarse en el orden inverso.

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución descritos en la presente pueden incluir uno o más agentes de tamponamiento. Por ejemplo, el agente tampón puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio o una combinación de los mismos. La concentración del agente tampón está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 500 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y 5 mM, entre aproximadamente 5 mM y 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y 50 mM, o entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, por ejemplo, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM.

El rendimiento después de la HIC puede variar. En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de arilsulfatasa A es por lo menos de aproximadamente el 60%, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 70%, por ejemplo, entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 100%. En algunas realizaciones, el rendimiento de proteína (UA o Unidades de Absorbancia) es de aproximadamente el 45% al 100%, por ejemplo, de aproximadamente el 50% a aproximadamente al 95%, o de aproximadamente el 55% a aproximadamente el 90%, por ejemplo, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

La pureza después de la HIC se mejora enormemente. En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es por lo menos de aproximadamente 50 U/mg a aproximadamente 140 U/mg, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 70 U/mg, por lo menos aproximadamente 90 U/mg, por lo menos aproximadamente 100 U/mg, o por lo menos aproximadamente 120 U/mg, por ejemplo, como se determina mediante un método descrito en la presente.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica a por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 98%, por lo menos aproximadamente el 99%, por lo menos aproximadamente el 99,5%, por lo menos aproximadamente el 99,6%, por lo menos aproximadamente el 99,7%, por lo menos aproximadamente el 99,8 %, o por lo menos aproximadamente el 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por *ejemplo*, mediante uno o más de: transferencia Western de proteína de la célula huésped (HCP), tinción con Coomassie SDS-PAGE, tinción con plata SDS-PAGE, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) está entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 1,2, por ejemplo, entre aproximadamente 0,7 y 0,95.

Ultrafiltración/Diafiltración

Los métodos de purificación descritos en la presente pueden incluir un paso de ultrafiltración y/o diafiltración en sentido descendente. En algunas realizaciones, el método comprende además concentrar y/o filtrar la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o diafiltración, por ejemplo, mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

La ultrafiltración se refiere a un proceso de separación de membrana, impulsado por un gradiente de presión, en el que la membrana fracciona los componentes de un líquido en función de su tamaño y estructura solvatados. La diafiltración es un tipo especializado de proceso de ultrafiltración en el que el retenido se diluye con agua y se vuelve a ultrafiltrar, para reducir la concentración de componentes permeados soluble y aumentar aún más la concentración de componentes retenidos. La ultrafiltración a menudo se combina con la diafiltración en pasos de purificación por ultrafiltración/diafiltración (UFDF).

En una realización específica, la invención utiliza un paso de purificación UFDF en sentido descendente. En algunas realizaciones, el rendimiento de proteína (UA o Unidades de Absorción) después de la UFDF en sentido descendente, con respecto a la cantidad del paso de purificación anterior, es de aproximadamente el 90% al 105%, por ejemplo, de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 100%, por ejemplo, de aproximadamente el 97% a aproximadamente el 99%, como se determina mediante espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm. En algunas realizaciones, esencialmente no se pierde proteína durante la UFDF.

En algunas realizaciones de la invención, la UFDF en sentido descendente da como resultado rASA que es por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 97%, por lo menos aproximadamente un 98%, por lo menos aproximadamente un 99% o más pura, como se determina mediante cromatografía de

exclusión por tamaño-cromatografía líquida de alto rendimiento (SEC-HPLC) y/o cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). En alguna realización, la arilsulfatasa A se purifica a por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 98%, por lo menos aproximadamente el 99%, por lo menos aproximadamente el 99,5%, por lo menos aproximadamente el 99,6%, por lo menos aproximadamente el 99,7%, por lo menos aproximadamente el 99,8 %, o por lo menos aproximadamente el 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de: transferencia Western de proteína de la célula huésped (HCP), tinción con Coomassie SDS-PAGE, tinción con plata SDS-PAGE, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión por tamaño. La actividad específica de la rASA es por lo menos de aproximadamente 60 U/mg a aproximadamente 100 U/mg, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 65 U/mg, por lo menos aproximadamente 90 U/mg, por lo menos aproximadamente 70 U/mg, o a por lo menos aproximadamente 90 U/mg, por ejemplo, como se determina mediante un ensayo de liberación de sulfatasa, como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica mediante separación de contaminantes de acuerdo con su tamaño en un entorno ácido mediante filtración de flujo tangencial. La arilsulfatasa A forma un octamero a pH bajo con un peso molecular teórico de 480 kDa y, por lo tanto, será retenida por una membrana relativamente abierta, mientras que la mayoría de los contaminantes pasarán por esta membrana (Sommerlade et al., (1994) Biochem. J., 297; 123-130; Schmidt et al., (1995) Cell, 82 271-278; Lukatela et al., (1998) Biochemistry, 37, 3654-3664).

En una realización típica, el tampón de diafiltración comprende fosfato de sodio-citrato 0,01 M, NaCl 0,137 M, pH 6,0.

En algunas realizaciones, como el material de partida para este proceso es una suspensión de arilsulfatasa A como se eluyó de la columna de cromatografía en el paso anterior del proceso, el pH en esta suspensión se ajusta a 4-5 mediante la adición de Na-acetato 0,2-1 M, pH 4.5. La diafiltración se realiza luego contra 1-10 volúmenes de tampón de Na-acetato pH 4,0-5,5 de una manera bien conocida por alguien experto en la técnica. La filtración puede realizarse con la aplicación de varios tipos de filtros diferentes con valores límite de peso nominal que varían de 20-450 kDa, sin embargo, es típico usar un filtro con un valor límite que varía de 100 a 300 kDa. Para el procesamiento adicional de la solución que contiene arilsulfatasa A, el pH se ajusta a un valor dentro del intervalo entre 7 y 8 mediante la adición de Tris-base a una concentración final de aproximadamente 20-50 mM.

Como alternativa a la filtración de flujo tangencial ácida como se ha descrito anteriormente, la separación de ASA de los contaminantes puede obtenerse con filtración de gel ácido usando esencialmente las mismas condiciones y composiciones de tampones. La filtración se realiza a pH bajo a través de una columna de filtración en gel, que se ha equilibrado con una solución a pH bajo, por ejemplo, una solución de Na-acetato 0,2-0,9 M a pH 4-5. Como opción, la solución de arilsulfatasa A puede concentrarse mediante filtración de flujo tangencial a través de un filtro de 20-50 kDa antes de la filtración en gel. El grado de concentración puede variar considerablemente, de tal manera que la arilsulfatasa A puede concentrarse de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferiblemente a aproximadamente 5 mg/ml.

En algunas realizaciones, la agrupación de muestras se concentra contra un Biomax A-screen, 30 kDa. La diafiltración se realiza contra 3-5 lavados de columna de Na-acetato 20 mM, pH 5,4-5,7.

Caracterización de proteínas ASA purificadas

La proteína ASA recombinante purificada puede caracterizarse usando varios métodos.

Pureza

La pureza de la proteína ASA recombinante purificada se mide típicamente por el nivel de varias impurezas (por ejemplo, proteína de la célula huésped o ADN de la célula huésped) presentes en el producto final. Por ejemplo, el nivel de proteína de la célula huésped (HCP) puede medirse mediante ELISA o SDS-PAGE. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada contiene menos de 150 ng HCP/mg de proteína ASA (por ejemplo, menos de 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 30, 20, 10 ng HCP/mg de proteína ASA). En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada contiene menos de aproximadamente 150 pg/mg, 140 pg/mg, 130 pg/mg, 120 pg/mg, 110 pg/mg, 100 pg/mg, 90 pg/mg, 80 pg/mg, 70 pg/mg, 60 pg/mg, 50 pg/mg, 40 pg/mg, 30 pg/mg, 20 pg/mg o 10 pg/mg de ADN de la célula huésped.

En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada, cuando se somete a SDS-PAGE con tinción con azul brillante de Coomassie, no tiene bandas nuevas con una intensidad mayor del 0,05%, 0,01%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35 %, 0,4%, 0,45% o 0,5% de control de ensayo. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada, cuando se somete a SDS-PAGE con transferencia Western contra HCP, no tiene bandas con una intensidad mayor que el control de ensayo de banda HCP de 15 kDa, y no tiene bandas nuevas con una intensidad mayor del 0,05%, 0,01 %, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5% o 1,0% que el control de ensayo. En algunas realizaciones, la proteína ASA recombinante purificada, cuando se somete a SDS-

PAGE con tinción de plata, no tiene nuevas bandas con una intensidad mayor del 0,05%, 0,01%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45% o 0,5% que el control de ensayo. En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de proteína de la célula huésped está entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,6, por ejemplo, entre aproximadamente 0,4 y 0,5. Pueden usarse varios controles de ensayo, en particular, aquellos aceptables para agencias reguladoras como la FDA.

La pureza de la proteína ASA recombinante purificada también puede determinarse mediante una o más de cromatografía de exclusión por tamaño-cromatografía líquida de alto rendimiento (SEC-HPLC), electroforesis capilar-SDS PAGE (CE-SDS PAGE) y/o cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (por ejemplo, usando columnas de sílice unida a octadecilo (C18), y realizada a un pH ácido con TFA como contraión). En algunas realizaciones de la invención, el pico principal en el cromatograma es ASA. Los parámetros que pueden alterarse u optimizarse para aumentar la resolución incluyen condiciones de gradiente, modificador orgánico, contraión, temperatura, tamaño de poro de columna y tamaño de partícula, composición de solvente y caudal. Los niveles de pureza pueden discernirse por el porcentaje de pico principal, como es conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la pureza puede determinarse integrando los picos principales y laterales observados y calculando el porcentaje del área total del pico principal. En algunas realizaciones de la invención, la pureza de ASA purificada por los métodos divulgados en la presente y como se determina mediante el porcentaje del pico principal de SEC-HPLC es mayor o igual al 95% (por ejemplo, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más alto). En algunas realizaciones de la invención, la pureza de la ASA purificada mediante los métodos divulgados en la presente y como se determina mediante el porcentaje del pico principal de RP-HPLC es mayor o igual al 98% (es decir, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más alto).

Actividad específica

La proteína ASA recombinante purificada también puede caracterizarse evaluando la actividad funcional y/o biológica. La actividad enzimática de una composición de ASA recombinante puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Típicamente, los métodos implican detectar la eliminación de sulfato de un sustrato sintético, que se conoce como ensayo de liberación de sulfato. Un ejemplo de un ensayo de actividad enzimática implica el uso de cromatografía iónica. Este método cuantifica la cantidad de iones sulfato que son liberados enzimáticamente por la ASA recombinante de un sustrato. El sustrato puede ser un sustrato natural o un sustrato sintético. En algunos casos, el sustrato es sulfato de heparina, sulfato de dermatán o un equivalente funcional de los mismos. Típicamente, el ion de sulfato liberado se analiza mediante cromatografía iónica con un detector de conductividad. En este ejemplo, los resultados pueden expresarse como U/mg de proteína donde 1 Unidad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ion de sulfato por hora del sustrato. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica de por lo menos aproximadamente 50 U/mg, 60 U/mg, 70 U/mg, 80 U/mg, 90 U/mg, 100 U/mg, 110 U/mg, 120 U/mg, 130 U/mg, 140 U/mg. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica que varía de aproximadamente 50-200 U/mg (por ejemplo, aproximadamente 50-190 U/mg, 50-180 U/mg, 50-170 U/mg, 50-160 U/mg, 50-150 U/mg, 50-140 U/mg, 50-130 U/mg, 50-120 U/mg, 50-110 U/mg, 50-100 U/mg, 60-200 U/mg, 60-190 U/mg, 60-180 U/mg, 60-170 U/mg, 60-160 U/mg, 60-150 U/mg, 60-140 U/mg, 60-130 U/mg, 60-120 U/mg, 60-110 U/mg, 60-100 U/mg, 70-200 U/mg, 70-190 U/mg, 70-180 U/mg, 70-170 U/mg, 70-160 U/mg, 70-150 U/mg, 70-140 U/mg, 70-130 U/mg, 70-120 U/mg, 70-110 U/mg, 70-100 U/mg, 80-200 U/mg, 80-190 U/mg, 80-180 U/mg, 80-170 U/mg, 80-160 U/mg, 80-150 U/mg, 80-140 U/mg, 80-130 U/mg, 80-120 U/mg, 80-110 U/mg, 80-100 U/mg, 90-200 U/mg, 90-190 U/mg, 90-180 U/mg, 90-170 U/mg, 90-160 U/mg, 90-150 U/mg, 90-140 U/mg, 90-130 U/mg, 90-120 U/mg, 90-110 U/mg, 90-100 U/mg, 100-200 U/mg, 100-190 U/mg, 100-180 U/mg, 100-170 U/mg, 100-160 U/mg, 100-150 U/mg, 100-140 U/mg, 100-130 U/mg, 100-120 U/mg, 100-110 U/mg, 110-200 U/mg, 110-190 U/mg, 110-180 U/mg, 110-170 U/mg, 110-160 U/mg, 110-150 U/mg, 110-140 U/mg, 110-130 U/mg, 110-120 U/mg, 120-200 U/mg, 120-190 U/mg, 120-180 U/mg, 120-170 U/mg, 120-160 U/mg, 120-150 U/mg, 120-140 U/mg, 120-130 U/mg, 130-200 U/mg, 130-190 U/mg, 130-180 U/mg, 130-170 U/mg, 130-160 U/mg, 130-150 U/mg, o 130-140 U/mg).

En otro ejemplo, la actividad enzimática de una composición de ASA recombinante puede determinarse midiendo la eliminación de sulfato de un sustrato de 4-metilumbeliferil-sulfato (4-MUF-sulfato) para formar la metilumbeliferona fluorescente. En este ejemplo, la señal de fluorescencia generada por una muestra de prueba puede usarse para calcular la actividad enzimática (en mU/ml) usando un estándar de 4-MUF. Una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 nanomol de 4-MUF-sulfato en 4-MUF en 1 minuto a 37° C. La actividad específica puede calcularse luego dividiendo la actividad enzimática por la concentración de proteína.

En algunas realizaciones, la actividad se determina por hidrólisis del sustrato cromogénico sintético, para-nitrocatecol sulfato (pNCS) que tiene un producto final, para-nitrocatecol (pNC) que absorbe la luz a 515 nm. La siguiente ecuación puede usarse para calcular la actividad enzimática en μ mol de pNCS hidrolizado/min x ml (= Unidades/ml):

$$\frac{V_{\text{tot}} (\text{ml})}{\epsilon M / 1000 \times V_{\text{muestra}} (\text{ml}) \times \text{Tiempo de incubación (min)}} \times \Delta A = \text{Unidades/ml (1)}$$

dónde:

ΔA = absorbancia de la muestra-absorbancia de blanco

$V_{\text{tot}} (\text{ml})$ = volumen total de reacción en ml (en este caso 0,15 ml)

$V_{\text{muestra}} (\text{ml})$ = volumen de muestra añadido en ml (en este caso 0,05 ml)

ϵM = el coeficiente de extinción molar para el producto pNC, que en este caso es 12 400 M⁻¹ cm⁻¹.

La ecuación 1 puede simplificarse como:

$$\Delta A \times (0.15 / (12\,400 / 1000 \times 0.05 \times 30)) =$$

$$X \mu\text{mol} / (\text{minuto} \times \text{ml}) (= \text{Unidades/ml}) (1)$$

Para calcular la actividad específica en μmol de pNC consumido/(minuto $\times$ mg) (= Unidades/mg), la ecuación 1 se divide por la concentración de proteína de la muestra:

$$\text{Ec. 1/ Conc. de proteína (mg/ml)} = Y \mu\text{mol} / (\text{minuto} \times \text{mg}) = \text{Unidades/mg (2)}$$

En cualquier ejemplo, la concentración de proteína de una composición de ASA recombinante puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica para determinar las concentraciones de proteína. En algunos casos, la concentración de proteína se determina mediante un ensayo de absorbancia de luz ultravioleta. Tales ensayos de absorbancia se realizan típicamente a una longitud de onda de aproximadamente 280 nm (A280).

En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica en un sustrato de 4-metilumbeliferona en un intervalo de aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 100,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 50,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 40,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 30,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 20,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg a 10,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 4,0 $\times 10^3$ mU/mg a 8,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 4,0 $\times 10^3$ mU/mg a 10,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 4,5 $\times 10^3$ mU/mg a 10,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 5,0 $\times 10^3$ mU/mg a 10,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 5,5 $\times 10^3$ mU/mg a 15,0 $\times 10^3$ mU/mg, o aproximadamente 4,0 $\times 10^3$ mU/mg a 20,0 $\times 10^3$ mU/mg. En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada tiene una actividad específica en un sustrato de 4-metilumbeliferona de aproximadamente 1,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 2,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 3,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 4,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 5,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 10,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 15,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 20,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 25,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 30,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 35,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 40,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 45,0 $\times 10^3$ mU/mg, aproximadamente 50,0 $\times 10^3$ mU/mg, o más.

Perfil de carga

La ASA recombinante purificada puede caracterizarse por el perfil de carga asociado con la proteína. Típicamente, el perfil de carga de la proteína refleja el patrón de cargas de cadenas laterales de residuos, típicamente presentes en la superficie de la proteína. El perfil de carga puede determinarse realizando un ensayo de cromatografía de intercambio iónico (IEX) (por ejemplo, HPLC) en la proteína. En algunas realizaciones, un "perfil de carga" se refiere a un conjunto de valores que representan la cantidad de proteína que eluye de una columna de intercambio iónico en un punto en el tiempo después de la adición a la columna de una fase móvil que contiene un ion de intercambio.

Típicamente, una columna de intercambio iónico adecuada es una columna de intercambio aniónico. Por ejemplo, un perfil de carga puede determinarse mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX) utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En general, la ASA recombinante se adsorbe en la carga positiva fija de una columna de intercambio aniónico fuerte y un gradiente de fuerza iónica creciente usando una fase móvil a un caudal predeterminado eluye las especies de ASA recombinante de la columna en proporción a la fuerza de su interacción iónica con la columna cargada positivamente. Las especies de ASA cargadas más negativamente (más ácidas) eluyen más tarde que las especies de ASA cargadas menos negativamente (menos ácidas). La concentración de proteínas en el eluato se detecta mediante absorbancia de luz ultravioleta (a 280 nm).

En algunas realizaciones, la ASA recombinante se adsorbe a aproximadamente un pH 8.0 en TRIS-HCl 20

mM sobre la carga positiva fija de una columna Mini Q PE y un gradiente de fuerza iónica creciente usando una fase móvil que consiste de TRIS-HCL 20 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 8,0 a un caudal de 0,8 ml/min eluye especies de ASA recombinantes de la columna en proporción a la fuerza de su interacción iónica con la columna cargada positivamente.

En algunas realizaciones, un perfil de carga puede representarse mediante un cromatograma de unidades de absorbancia frente al tiempo después de la elución de la columna de HPLC. El cromatograma puede comprender un conjunto de uno o más picos, con cada pico en el conjunto identificando una subpoblación de ASA recombinantes de la composición que tienen cargas superficiales similares.

Mapeo de glicanos

En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada puede caracterizarse por su composición de proteoglicanos, típicamente referida como mapeo de glicanos. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se piensa que el enlace de glicanos junto con la forma y la complejidad de la estructura de rama pueden afectar a la depuración in vivo, la focalización lisosómica, la biodisponibilidad y/o la eficacia.

Típicamente, un mapa de glicanos puede determinarse mediante digestión enzimática y posterior análisis cromatográfico. Pueden usarse varias enzimas para la digestión enzimática incluyendo, pero no limitadas a, glicosilasas, peptidasas (por ejemplo, endopeptidasas, exopeptidasas), proteasas y fosfatasas adecuadas. En algunas realizaciones, una enzima adecuada es la fosfatasa alcalina. En algunas realizaciones, una enzima adecuada es la neuraminidasa. Los glicanos (por ejemplo, fosfoglicanos) pueden detectarse mediante análisis cromatográfico. Por ejemplo, los fosfoglicanos pueden detectarse por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD) o cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (HPLC). La cantidad de glicano (por ejemplo, fosfoglicano) representada por cada pico en un mapa de glicanos puede calcularse usando una curva estándar de glicano (por ejemplo, fosfoglicano), de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y divulgados en la presente.

En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada de acuerdo con la presente invención se caracteriza con un mapa de glicanos que comprende por lo menos siete grupos pico indicativos de proteína ASA neutra (grupo de pico 1), mono-sialilada (grupo de pico 2), protegida con manosa-6-fosfatada (grupo de pico 3), di-sialilada (grupo de pico 4), mono-manosa-6-fosfatada (grupo de pico 5), híbrida (grupo de pico 6) y di-manosa-6-fosfatada (grupo de pico 7), respectivamente.

Mapeo de péptidos

En algunas realizaciones, puede usarse mapeo de péptidos para caracterizar la composición de aminoácidos, modificaciones postraduccionales y/o procesamiento celular; como la escisión de un péptido señal, y/o glicosilación. Típicamente, una proteína recombinante puede dividirse en fragmentos de péptidos discretos, ya sea mediante rotura controlada o aleatoria, para producir un patrón o mapa de péptidos. En algunos casos, una proteína ASA purificada puede someterse primero a digestión enzimática antes del análisis analítico. La digestión puede realizarse usando una peptidasa, glicósido hidrolasa, fosfatasa, lipasa o proteasa y/o combinaciones de las mismas, antes del análisis analítico. La composición estructural de los péptidos puede determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear (NMR) o HPLC.

Análisis de metales

En algunas realizaciones, una proteína ASA recombinante purificada puede caracterizarse por análisis de metales. En la técnica se conocen varios métodos para analizar metales traza en sustancias farmacológicas purificadas y pueden usarse para poner en práctica la presente invención.

En algunas realizaciones, el fósforo residual se mide y se compara con una muestra de referencia. Sin desear estar limitado a ninguna teoría en particular, se hace la hipótesis de que el fósforo residual contribuye a mantener el pH de la sustancia farmacológica. En algunas realizaciones de la invención, el fósforo residual está entre aproximadamente 10-50 ppm (es decir, entre aproximadamente 10-45 ppm, aproximadamente 10-40 ppm, aproximadamente 10-30 ppm, aproximadamente 20-50 ppm aproximadamente 20-45 ppm, aproximadamente 20-40 ppm, aproximadamente 20-30 ppm, aproximadamente 30-50 ppm, aproximadamente 30-40 ppm). En algunas realizaciones, el intervalo de pH de la ASA recombinante purificada de acuerdo con los métodos divulgados en la presente está entre aproximadamente 5-7 (es decir, entre aproximadamente 5,5-7,0, aproximadamente 5,5-6,5, aproximadamente 5,5-6,0, aproximadamente 6,0-7,0, aproximadamente 6,0-6,5, aproximadamente 6,0-6,4, aproximadamente 6,0-6,3, aproximadamente 6,0-6,2, aproximadamente 6,0-6,1, aproximadamente 6,1-6,2).

En algunas realizaciones, la ASA recombinante purificada de acuerdo con los métodos divulgados en la presente contiene calcio. Sin desear estar limitado a ninguna teoría en particular, se hace la hipótesis de que los

iones de calcio presentes en el sitio activo de ASA pueden ser necesarios para la actividad enzimática. En algunas realizaciones de la invención, el calcio está presente en niveles entre aproximadamente 1-20 ppm (es decir, entre aproximadamente 1-15 ppm, aproximadamente 1-10 ppm, aproximadamente 5-15 ppm, aproximadamente 5-10 ppm, aproximadamente 10-20 ppm, aproximadamente 10-15 ppm, aproximadamente 10-14 ppm, aproximadamente 10-13 ppm, aproximadamente 10-12 ppm).

Composición farmacéutica y administración

La proteína ASA recombinante purificada puede administrarse a un paciente con MLD de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, la proteína ASA recombinante purificada puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosal (por ejemplo, por vía oral o nasal).

En algunas realizaciones, una ASA recombinante o una composición farmacéutica que contiene la misma se administra a un sujeto mediante administración intravenosa.

En algunas realizaciones, un ASA recombinante o una composición farmacéutica que lo contiene se administra a un sujeto mediante administración intratecal. Como se usa en la presente, el término "administración intratecal" o "inyección intratecal" se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Pueden usarse varias técnicas, incluyendo sin limitación, inyección cerebroventricular lateral a través de un trepanado o punción cisternal o lumbar o similares. En algunas realizaciones, "administración intratecal" o "suministro intratecal" de acuerdo con la presente invención se refiere a administración o suministro IT lumbar. Como se usa en la presente, el término "región lumbar" o "área lumbar" se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. En algunas realizaciones, una ASA recombinante o una composición farmacéutica que contiene la misma se administra a un sujeto mediante administración intratecal como se describe en las publicaciones internacionales de PCT WO2011/163648 y WO2011/163650.

En algunas realizaciones, una ASA recombinante o una composición farmacéutica que contiene la misma se administra al sujeto mediante administración subcutánea (es decir, por debajo de la piel). Para tales propósitos, la formulación puede inyectarse usando una jeringuilla. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para la administración de la formulación como los dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos Inject-ease y Genject); plumas inyectoras (como la GenPen); dispositivos sin aguja (por ejemplo, MediJector y BioJector); y sistemas de administración de parches subcutáneos.

En algunas realizaciones, la administración intratecal puede usarse junto con otras vías de administración (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosal (por ejemplo, oral o nasal)).

La presente divulgación contempla administraciones tanto simples como múltiples de una cantidad terapéuticamente eficaz de una ASA recombinante o una composición farmacéutica que contiene la misma descrita en la presente. Una ASA recombinante o una composición farmacéutica que contiene la misma puede administrarse a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, la gravedad y el alcance de la afección del sujeto (por ejemplo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una ASA recombinante o una composición farmacéutica que la contiene puede administrarse periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimensualmente (una vez cada dos meses), mensualmente (una vez al mes), bisemanalmente (una vez cada dos semanas), semanalmente, diariamente o continuamente).

Una ASA recombinante o una composición farmacéutica que la contiene puede formularse con un portador o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El portador y el agente terapéutico pueden ser estériles. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábica, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos como lactosa, amilosa o almidón, azúcares como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias aromatizantes y/o aromáticas y similares) que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos ni interfieren con su actividad. En algunas realizaciones, se usa un portador soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

La composición o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. La composición puede ser una solución líquida,

suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición también puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La composición o medicamento puede formularse de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición para administración intravenosa es típicamente una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se formula en una solución isotónica como NaCl 154 mM o NaCl al 0,9% y fosfato de sodio 10-50 mM pH 6,5-8,0 o fosfato de sodio, glicina, manitol o las sales de potasio correspondientes. En otra realización, la ASA se formula en un tampón fisiológico, como:

- a) tampón de formulación I que contiene (en mM): Na_2HPO_4 (3,50-3,90), NaH_2PO_4 (0-0,5), Glicina (25-30), Manitol (230-270), y agua para inyección; o
- b) tampón de formulación II que contiene (en mM): Tris-HCl (10), glicina (25-30), manitol (230-270) y agua para inyección.

La arilsulfatasa A purificada mediante un método divulgado en la presente puede usarse como un medicamento para reducir los niveles de 3-O-sulfogalactosilceramida (galactosil sulfatida) de esfingolípidos dentro de las células en el sistema nervioso periférico y/o dentro del sistema nervioso central en un sujeto que padece y/o al que se le ha diagnosticado leucodistrofia metacromática. La administración de ASA llevará a una disfunción disminuida de las habilidades de aprendizaje motor y/o al aumento de la velocidad de conducción motora nerviosa y/o la amplitud de la conducción nerviosa. Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida en base a la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Por lo general, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, como una cantidad suficiente para modular los receptores de enzimas lisosómicos o su actividad para tratar de este modo la enfermedad de almacenamiento lisosómico o los síntomas de la misma (por ejemplo, una reducción o eliminación de la presencia o incidencia de "cuerpos de cebra" o vacuolización celular después de la administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto). Generalmente, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima lisosómica recombinante) administrada a un sujeto con necesidad de ello dependerá de las características del sujeto. Tales características incluyen la afección, la gravedad de la enfermedad, el estado general de salud, la edad, sexo y peso corporal del sujeto. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, pueden emplearse opcionalmente tanto ensayos objetivos como subjetivos para identificar intervalos de dosificación óptimos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y/o tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de reemplazo enzimático y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente son solo ejemplares.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Ultrafiltración de flujo tangencial - captura

Este ejemplo demuestra que la ultrafiltración de flujo tangencial (también conocida como filtración de flujo cruzado) puede usarse para capturar la proteína ASA recombinante directamente del biorreactor de producción.

Específicamente, se capturó el material en bruto no purificado de un biorreactor de perfusión de producción mediante ultrafiltración de flujo tangencial. La filtración de flujo tangencial se realizó en una membrana Sartorius Hydrosart® de 30 kD Standard dentro de las especificaciones del fabricante.

Se realizaron experimentos adicionales en los que se realizó filtración de flujo tangencial con una membrana Sartorius HYDROSART® ECO manteniendo la misma composición y límite de peso molecular. La membrana ECO permitió que el proceso utilizara tasas de flujo cruzado más bajas.

Los valores de flujo de permeado (LMH) producidos a partir de las doce condiciones de ejecución de excursión realizadas usando las membranas ECO y estándar se analizaron usando la función de perfilador de contorno. Esta función mostró contornos de respuesta para dos factores a la vez. En este estudio, el caudal de alimentación y la presión transmembrana ("TMP") se compararon con el flujo de permeado para cada membrana. Los resultados ejemplares se muestran en la Figura 3.

Como puede verse, un diagrama de contorno de los recorridos de excursión de membrana ECO frente a estándar, la membrana ECO mostró una salida de flujo mucho más robusta en los intervalos de parámetros dados probados. La membrana ECO fue capaz de lograr tasas de flujo más altas a un caudal de alimentación más bajo dentro del intervalo operativo.

Más específicamente, en base al análisis de datos de las ejecuciones de diseño, la recuperación de títulos de Elisa varía de aproximadamente el 92% al 132%. Los valores de reducción logarítmica de la proteína de la célula huésped (HCP) varían de aproximadamente 0,11 a 0,38. La recuperación de títulos de ELISA, los valores de reducción logarítmica de la proteína de la célula huésped (HCP) y el porcentaje de recuperación de actividad se determinaron como se describe en otra parte en la solicitud.

Los resultados de este experimento demostraron la viabilidad de implementar un paso de captura de UFDF en el proceso de purificación de fase III de la arilsulfatasa A. En base a una ejecución de excursión de UFDF de lado a lado, la membrana ECO fue particularmente eficaz ya que era capaz de lograr caudales más altos a un caudal de alimentación más bajo dentro del intervalo operativo. También se realizaron experimentos de diseño usando la membrana ECO para evaluar el impacto potencial sobre los parámetros operativos de desafío de carga, TMP, caudal de alimentación, factor de concentración inicial y temperatura de procesamiento sobre el rendimiento del proceso de captura de rhASA. El ELISA de la proteína de la célula huésped (HCP) y el rendimiento del paso de actividad no se vieron afectados significativamente por los parámetros operativos de la membrana ECO.

Ejemplo 2. Filtración en profundidad e inactivación viral

Este experimento ilustra las condiciones para la filtración en profundidad y la inactivación viral que pueden implementarse durante el proceso de purificación.

Por ejemplo, el material en bruto no purificado capturado se descongeló a 2-8° C durante ≤ 120 h. La temperatura del material en bruto se ajustó a aproximadamente $18 \pm 2^\circ$ C y se filtró a través de un filtro de profundidad Cuno Zeta Plus seguido de filtración por purificación. Se conectó una cápsula de filtración por purificación Sartorius Maxicap Sartopore 2, $0,45 \pm 0,2$ μ m en sentido descendente del filtro de profundidad para eliminar partículas y reducir la carga biológica en preparación para el procesamiento en sentido descendente. Los filtros se limpian con agua para inyección ("WFI") seguido de solución de equilibrio de MES-Tris, pH 7.1.

Se realizó un enjuague final después de la filtración para recuperar el material de retención del tren de filtración. Una vez que se completó la filtración, el tren de filtración se limpió con solución de enjuague de MES-Tris 0,05M, pH 7,0. El enjuague recogido se añadió al material en bruto agrupado filtrado.

El volumen filtrado pero no purificado se procesó posteriormente a través de un paso de inactivación viral mediante la adición de Polisorbato 80 y Tri-n-butil-fosfato (TnBP) con aproximadamente 3-24 horas de incubación posterior de la siguiente manera. Se añadió polisorbato 80 a partir de una solución madre al 10% (v/v) en MES-Tris 0,05 M, pH 7,1 a la masa filtrada agrupada no purificada para lograr una concentración final del 1%. Luego se añadió tri-n-butil-fosfato (TnBP) a una concentración final de aproximadamente el 0,3% calculada en base al nuevo volumen de masa no purificada que contiene Polisorbato 80. La agrupación resultante se mezcló para obtener consistencia y se incubó con mezcla continua durante aproximadamente 3 -24 horas.

Cuando se completó la inactivación viral, la agrupación se procesó a través de un filtro de 0,2 μ m de difluoruro de polivinilidina (PVDF) antes de cargarlo en la primera columna de cromatografía. En este experimento, la

agrupación inactivada viral filtrada se aplicó a una columna Q (como se describe a continuación) en el plazo de aproximadamente 28 horas del tiempo de inicio de la incubación de inactivación viral. El producto intermedio viral inactivado se filtró, y al final de la filtración, el filtro se limpió con MES-Tris 0,05 M, tampón de pH 7.0 para maximizar la recuperación del producto.

Ejemplo 3. Cromatografía de intercambio aniónico

Este ejemplo ilustra condiciones ejemplares para la cromatografía de intercambio aniónico, en particular, cuando la cromatografía de intercambio aniónico se usó como el primer paso de cromatografía. En este ejemplo particular, se usó resina Q SEPHAROSE™ Fast Flow (Q FF) en un intercambio aniónico de amina cuaternaria operado en modos de unión y elución.

Las columnas Q FF se prepararon usando métodos estándar. La ASA se unió a la columna Q a un pH de 7,0 y se eluyó con MES-Tris 0,02 M, NaCl 0,26 M a pH 7,1. La carga, el lavado y la elución se realizaron a un caudal de aproximadamente 100° C. La temperatura operativa varía de 16-23°C. La elución Q se recogió mediante absorbancia a 280 nm (A280) con puntos de ajuste de 0,5 UA/cm en el lado ascendente del pico a 0,25 UA/cm en el lado descendente del pico. Las condiciones ejemplares usadas para las columnas de intercambio aniónico se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2: Condiciones ejemplares usadas para columnas de intercambio aniónico

Soluciones	Uso
0.5M NaOH	Saneamiento
0.02M MES-Tris, 1M NaCl, pH 7.0	Pre-equilibrio y tira
0.05M MES-Tris, pH 7.0	Equilibrio y lavado 1
0.02M MES-Tris, 0.12M NaCl, pH 7.1	Lavado 2
0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.1	Elución y captador de filtro post-uso
0.5M NaOH, 3M NaCl	Limpieza
0.01M NaOH	Almacenamiento

Se realizaron experimentos adicionales para comparar de resinas de intercambio aniónico ejemplares con respecto a la pureza, la actividad y el rendimiento (por ejemplo, la capacidad de carga del objetivo). En particular, para facilitar la ampliación, en este estudio se examinaron y evaluaron varias resinas de intercambio aniónico de alta capacidad.

Una vez "compactada", la resina se equilibró, cargó, lavó y eluyó usando las condiciones que se muestran en la Tabla 3. En este estudio, las condiciones de unión se mantuvieron igual que el proceso Q FF descrito anteriormente. Se recogieron fracciones de flujo a través (FT), lavado (W) y elución/tira (EL/tira) y se analizaron usando absorbancia A280, ensayo de titulación y SDS-PAGE (tinción de Coomassie y Plata).

TABLA 3. Condiciones ejemplares

Paso	Tampón o material
Equilibrio	50mM MES-Tris, pH7.0
Carga	Atlas GMP-1 H19/20 UPB
Lavado	50mM MES-Tris, pH7.0
Eluido/tira	50mM MES-Tris, 1M NaCl, 7.0

Se evaluaron siete resinas además de Q FF para determinar la capacidad de unión, selectividad y recuperación. El rendimiento global fue comparable para todas las resinas en un intervalo del 80-83%, indicando una recuperación similar y una operación experimental consistente. Algunas resinas tenían menos capacidad de unión que Q FF, mientras que otras tenían mayores capacidades de unión. En particular, el Fractogel demostró la mayor capacidad de unión, la mejor selectividad entre todas las resinas probadas y una recuperación comparable. Además, se observó muy poca pérdida de producto en el flujo a través del Fractogel a una carga de 15 g/l.

En la Tabla 4 se muestran resultados ejemplares que muestran el rendimiento y la capacidad de unión de la resina Q FF y Fractogel.

TABLA 4: Resultados ejemplares de capacidades de unión y rendimiento

Resina	Rendimiento A280				Unión (AU/I)
	FT	Lavado	Elución/tira	Suma	
Q FF	37%	2%	42%	82%	62
Fractogel	17%	2%	62%	81%	83

Ejecuciones de confirmación en paralelo

Para verificar el proceso de Fractogel y evaluar su impacto sobre los pasos de purificación posteriores y la calidad final de la sustancia farmacológica ("DS"), se realizaron procesos de purificación en paralelo de Fractogel TMAE frente a Q FF a partir de material en bruto no purificado a través de la sustancia farmacológica, incluyendo los pasos cromatográficos descritos en los presentes ejemplos. Los pasos de purificación adicionales después de la cromatografía de intercambio aniónico fueron los que se describen a continuación (presentados en orden de ejecución): cromatografía de modo mixto en columna HA, cromatografía de interacción hidrófoba en columna de fenilo, cromatografía de intercambio catiónico en columna SP y dos pasos de ultrafiltración/diafiltración con un paso de filtración viral intermedio.

Los rendimientos de A280 y de título fueron comparables. Las reducciones de HCP también fueron similares en todas las columnas.

Además, los geles SDS-PAGE (plata) (Figura 4) mostraron perfiles de banda similares para tanto Fractogel como Q FF durante todo el proceso. Los datos de CE-SDS mostraron una mejor pureza para Fractogel que Q FF como primer paso, pero resultados comparables después del paso de columna de fenilo. Esto fue confirmado por la proporción HCP/rhASA.

Se evaluaron los atributos de calidad para el eluato de SP de ambas columnas, así como un eluido de SP de ejecución de control. Los procesos de Fractogel y Q FF proporcionaron un eluato de SP similarmente puro y aceptable, aunque ciertos atributos diferían ligeramente del control debido a las diferencias en los materiales de partida de carga no purificada.

En general, el uso de Fractogel como primera columna proporcionó un rendimiento de proceso comparable (rendimientos, reducción de HCP) y atributos de calidad de SP al proceso de control que usa Q FF, como lo confirman los resultados anteriores. Sin embargo, la columna de Fractogel proporcionó una mayor capacidad de carga y un mayor rendimiento.

En conclusión, las ejecuciones de confirmación paralelas mostraron que el proceso TMAE de Fractogel tuvo un rendimiento comparable (rendimientos, eliminación de HCP) al proceso de Q FF, pero proporcionó el beneficio añadido de una capacidad de carga objetivo más alta (por ejemplo, por lo menos 10 g de rhASA/I). No se observó pérdida de rendimiento significativa para el intervalo de carga caracterizado entre 5-20 g/l. Los atributos de calidad del eluato de SP de la ejecución de Fractogel también fueron comparables a la ejecución de Q FF de control.

Ejemplo 4. Cromatografía de hidroxiapatita (HA) de modo mixto

Este ejemplo ilustra las condiciones ejemplares para la cromatografía de hidroxiapatita de modo mixto que pueden usarse en la purificación de proteína ASA recombinante.

Específicamente, el eluato de cromatografía de intercambio aniónico, preparado como antes, se purificó posteriormente por cromatografía de hidroxiapatita (HA). Se preparó una columna de resina de tipo 1 de hidroxiapatita cerámica comercialmente disponible. En este ejemplo, la columna se preequilibró con un tampón de fosfato de sodio 0,250 M, pH 7,0.

La columna de HA se hizo funcionar en modos de unión y eluato. El eluato de intercambio aniónico se calentó primero a temperatura ambiente y luego se ajustó a aproximadamente 0,001 M de fosfato de sodio antes de cargarlo en la columna de HA. La rhASA se unió a la columna a pH 7,0 y se eluyó de la columna con aproximadamente 0,04 M de fosfato de sodio, pH 7,1. La carga, el lavado y la elución se realizaron a un caudal de aproximadamente 150 cm/h. La elución de HA se recogió mediante absorbancia a puntos de ajuste de 280 nm (A280) de 0,5 UA/cm en el lado ascendente del pico a 0,25 UA/cm en el lado descendente del pico. Las condiciones ejemplares usadas para las columnas de HA se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5: Condiciones ejemplares utilizadas para columnas de HA

Soluciones	Uso
0.5M NaOH	Saneamiento
0.25M Fosfato de sodio, pH 7.0	Carga y ajuste de carga
0.001M Fosfato de sodio, 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0	Equilibrio y lavado 1
0.005M Fosfato de sodio, 0.02M MES-Tris, 0.26M NaCl, pH 7.0	Lavado 2
0.04M Fosfato de sodio, pH 7.1	Elución y captador de filtro post-uso
0.4M Fosfato de sodio, pH 12	Tira
0.5M NaOH	Limpieza
0.1M NaOH	Almacenamiento

20 Ejemplo 5. Cromatografía de interacción hidrófoba (fenilo)

Este ejemplo ilustra condiciones ejemplares para la cromatografía de interacción hidrófoba (fenilo) que pueden usarse en la purificación de la proteína ASA recombinante.

25 Específicamente, el eluato de cromatografía en columna de HA, preparado como antes, se purificó posteriormente mediante cromatografía en columna de fenilo. Se compactó y preparó una columna de fenilo Sepharose Fast Flow disponible comercialmente para la purificación de rhASA.

30 La columna de fenilo se hizo funcionar en el modo de unión y elución. Después de calentar a temperatura ambiente, el eluato de HA se ajustó a aproximadamente NaCl 1,1 M y a un pH de aproximadamente 5,6 usando MES 0,5 M, libre de ácido antes de cargarlo en la columna de fenilo. La rhASA se unió a la columna a pH 5,6 y se eluyó de la columna usando MES-Tris 0,02 M, NaCl 0,06 M, pH 7,1. La carga, el lavado y la elución se realizaron a un caudal de aproximadamente 150 cm/h. El eluato de fenilo se recogió mediante absorbancia a puntos de ajuste de 280 nm (A280) de 0,5 UA/cm en el lado ascendente del pico a 0,25 UA/cm en el lado descendente del pico. Las condiciones ejemplares para columnas de fenilo se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6: Condiciones ejemplares para columnas de fenilo

Soluciones	Uso
0.5M NaOH	Saneamiento y Limpieza
0.05M Fosfato de sodio, 1M NaCl, pH 5.6	Equilibrio y lavado1
5M NaCl	Ajuste de carga
0.5M MES, ácido libre	Ajuste de carga
0.02M MES, 0.05M Fosfato de sodio, 0.5M NaCl, pH 5.6	Lavado2
0.02M MES-Tris, 0.06M NaCl, pH 7.1	Elución y captador de filtro post-uso
WFI	Tira
0.01M NaOH	Almacenamiento

55 Ejemplo 6. Cromatografía de intercambio catiónico

Este ejemplo ilustra condiciones ejemplares para la cromatografía de intercambio catiónico que pueden usarse en la purificación de la proteína ASA recombinante.

60 Específicamente, el eluato de cromatografía en columna de fenilo, preparado como antes, se purificó posteriormente por cromatografía de intercambio catiónico. En este ejemplo, se compactó y preparó una columna SP-650M (TOYOPEARL).

65 La columna SP se hizo funcionar en el modo de unión y elución. El eluato de la columna de fenilo se calentó a 16-23° C y luego se diluyó con WFI para disminuir la conductividad, y se ajustó con ácido acético aproximadamente 1 M a pH 4,2 antes de cargarlo en la columna SP. La rhASA se unió a la columna a pH 4,2 y se

eluyó de la columna usando acetato de sodio 0,01 M, ácido acético 0,01 M, NaCl 0,05 M, pH 4,5. La carga, el lavado y la elución se realizaron a un caudal de aproximadamente 150 cm/h. La elución SP se recogió mediante absorbancia a puntos de ajuste de 280 nm (A280) de 0,25 UA/cm en el lado ascendente del pico a 0,25 UA/cm en el lado descendente del pico. Las condiciones ejemplares para las columnas SP se muestran en la Tabla 7.

5

TABLA 7: Condiciones ejemplares para columnas SP

Soluciones	Uso
0.5 M NaOH	Saneamiento y Limpieza
0.013 M Acetato de sodio, 0.007 M Ácido acético, 1M NaCl, pH 4.5	Pre-equilibrio y tira
0.01 M Acetato de sodio, 0.01 M NaCl, 0.03 M Ácido acético, pH 4.2	Equilibrio y lavado
0.01 M Acetato de sodio, 0.01 M Ácido acético, 0.05 M NaCl, pH 4.5	Elución y captador de filtro post-uso
1M Ácido acético	Ajuste de carga
WFI	Ajuste de carga
0.01 MNaOH	Almacenamiento

Ejemplo 7. Ultrafiltración/diafiltración y filtración viral.

Este ejemplo ilustra condiciones ejemplares para ultrafiltración/diafiltración y filtración viral que pueden usarse en la purificación de proteína ASA recombinante.

25

Ultrafiltración/diafiltración 1

La agrupación de elución SP se concentró y se diafiltró usando una membrana Hydrosart Sartocoon de 10 kDa. La agrupación de productos se concentró hasta aproximadamente 15 mg/ml y se diafiltró con 6-8 volúmenes de fosfato-citrato de sodio 0,01 M, NaCl 0,137 M, pH 6,0. La agrupación de productos concentrados y diafiltrados se procesó luego a través de un filtro de 0,2 µm.

30

La agrupación concentrada/diafiltrada se filtró a 0,2 µm y se almacenó a 2-8° C, típicamente, durante menos de aproximadamente 24 horas.

35

Filtración viral

Una operación de filtración viral puede ser seguida de ultrafiltración/diafiltración 1 para eliminar cualquier partícula tipo viral de la corriente del proceso. Por ejemplo, se configuró un tren de filtración con bomba, filtro Planova y manómetro. El filtro se limpió con 1 l de NaCl 0,154 M a través del lado retenido y luego más de 3 l a través del lado de permeado a una presión objetivo de 11.01b/in². Al finalizar, el filtro se limpió con 4 l de NaCl 0,154 M para aumentar la recuperación del producto. Se realizó una prueba de partículas de oro en el filtro después del uso para garantizar que se mantuviera la integridad del filtro.

40

45

Ultrafiltración/diafiltración 2

El material viral filtrado se concentró a 15-30 mg/ml y se diafiltró con 6-8 diavolúmenes de tampón de diafiltración de NaCl 0,154 M usando una membrana Hydrosart Sartocoon UFDF de 10 kDa. Una vez completada la diafiltración, el material se concentró adicionalmente a 48-50 mg/ml. El sistema se limpió luego con tampón de diafiltración. Luego se añadió una cantidad apropiada de enjuague de sistema al concentrado del producto para lograr una concentración final objetivo de aproximadamente 40 mg/ml.

50

Ejemplo 8. Funcionamiento de unidad de ultrafiltración/diafiltración individual

55

El proceso descrito en el Ejemplo 7 implica ultrafiltración/diafiltración ("UFDF") del eluato de columna SP (UFDF1), filtración viral del concentrado de UFDF1, y una UFDF final del filtrado viral (UFDF2) para producir la sustancia farmacológica pre-final (DS). En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo ejemplar de tales procesos.

En este ejemplo, se realizaron experimentos adicionales para determinar la viabilidad de eliminar una de las operaciones de la unidad de UFDF para reducir el tiempo total del proceso, el costo y aumentar potencialmente el rendimiento del proceso. Por tanto, se realizaron estudios para evaluar la viabilidad de realizar la filtración viral del eluato de SP ajustado con pH, seguido de una sola operación de la unidad de UFDF para generar la sustancia farmacológica filtrada pre-final ("DS").

60

65

Los estudios utilizaron materiales fuente parcialmente purificados que se habían purificado con anterioridad a partir de material en bruto no purificado ("UPB") a través de eluato de SP, como se ha descrito anteriormente. El eluato de SP se usó como carga para las tres ejecuciones de UFDF realizadas en el estudio actual, incluyendo dos ejecuciones experimentales de viabilidad y una ejecución de control del proceso de doble UFDF como se ha descrito anteriormente. Las dos ejecuciones experimentales (también conocidas como de viabilidad) consistieron de una UFDF seguido de ajuste de pH de la agrupación de eluato de SP y una ultrafiltración/doble diafiltración ("UFDFDF"). El eluato de SP para las ejecuciones de viabilidad se ajustó a pH 6,0 y posteriormente se filtró viralmente a través de, por ejemplo, un filtro viral Planova 20N. Las ejecuciones experimentales se compararon con una ejecución de control de UFDF1-filtración viral-UFDF2, como se ha descrito anteriormente.

El eluato de SP se ajustó a pH 6,0, se filtró viralmente y se asignó en dos volúmenes iguales; cada prueba de viabilidad experimental utilizó una de las dos agrupaciones de filtrado viral. Se diseñó una formulación de tampón de ajuste de pH de agrupación de elución de SP ejemplar como se expone en la Tabla 8. Se determinó un método de adición de volumen por volumen de aproximadamente 0,075 l de tampón de ajuste/l de eluato de SP para producir el pH objetivo de aproximadamente 6,0.

TABLA 8: Tampón de ajuste de pH ejemplar

Componente Químico	Concentración (g/l)	Concentración (mM)
Fosfato de Sodio, Monobásico	4	30
Fosfato de Sodio, Dibásico	58	220
Citrato de Sodio, Dihidrato	10	34
Cloruro de Sodio	77	1330

Tras recibir la agrupación de eluato de SP para ejecuciones experimentales, se realizó un ajuste de pH a 6,0; el ajuste produjo eluato de SP con pH de 5,98. El eluato de SP ajustado con pH se filtró luego viralmente en un filtro Planova 20N.

La Tabla 9 contiene un resumen de los rendimientos de los pasos de operación de la unidad individual. Como se observa, todas las ejecuciones de UFDF mostraron rendimientos de recuperación basados en A280 similares. Una operación de la unidad de filtración viral experimental produjo un rendimiento escalonado del 106,6%, indicando que no se perdió ninguna proteína absorbente de A280 durante la filtración. El rendimiento para la filtración viral fue significativo ya que verificó que el ajuste del pH a aproximadamente 6,0 permitió que la molécula de octamero de rhASA de 20 nm de diámetro se disociara en la forma dimérica. Se pensó que en condiciones ácidas (pH 5,0) la molécula de rhASA existe como un octamero, pero a pH neutro se disocia en forma dimérica. Como el Planova 20N tiene un tamaño de poro de 20 nm, era importante que la conformación molecular de la proteína rhASA no estuviera en forma de octamero porque la rhASA octamérica probablemente podría ser retenida/perdida dentro del filtro viral. Los datos de rendimiento escalonado confirmaron la viabilidad de realizar la filtración viral antes de la operación de UFDF ajustando el pH del eluato de SP. Estos datos de rendimiento indicaron que la rhASA no se perdió durante la filtración viral, y el ajuste del pH fue un paso importante tanto en la eficiencia de la purificación como en el pH de la formulación de las sustancias farmacológicas dirigidas.

TABLA 9: Resumen del rendimiento de los pasos

Ejecución	Rendimiento del Paso
Viabilidad de la Filtración Viral	106.6%
Ejecución Experimental 1 - UFDFDF	97.5%
Ejecución Experimental 2 - UFDF	99.6%
UFDF1 de Control	99.3%
UFDF2 de Control	98.0%

Tras la finalización de la filtración viral, la agrupación de filtrado viral se dividió uniformemente en dos porciones. Una porción se alimentó en la Ejecución Experimental 1 (UFDFDF) y la otra se alimentó en la Ejecución Experimental 2 (UFDF).

Como se evidencia a continuación, ambas ejecuciones experimentales produjeron una permeabilidad media similar durante los segmentos UF y DF inicial. Adicionalmente, el segundo segmento de DF del Experimental 1 mostró una permeabilidad media similar a los segmentos UF y DF inicial. La ejecución de control UFDF1 y UFDF2

produjeron ambos valores de permeabilidad media consistentemente más bajos en comparación con las ejecuciones de viabilidad, que pueden haber sido provocados por la variabilidad dentro de la escala de los dispositivos utilizados.

TABLA 10: Permeabilidad media y tiempos totales de procesamiento

Ejecución	Permeabilidad Media de UF (LMH/psi)	Permeabilidad Media de DF1 (LMH/psi)	Permeabilidad Media de DF2 (LMH/psi)	Tiempo de Procesamiento Total (min)
Experimental 1; UFD FDF	2.5	2.4	2.3	86
Experimental 2; UFDF	2.5	2.6	N/A	60
UFDF1 de Control	1.6	1.5	N/A	58
UFDF2 de Control	1.6	1.3	N/A	48

La calidad del producto de la sustancia farmacológica de la ejecución de control y las ejecuciones experimentales se compararon mediante una serie de ensayos analíticos que incluyen: SEC-HPLC, RP-HPLC, Actividad, SDS-PAGE/HCP Western, SDS-PAGE (Coomassie), mapeo de glicanos, mapeo de péptidos y análisis de metales.

SEC-HPLC y RP-HPLC

La Tabla 11 proporciona resultados de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y fase inversa (RP-HPLC). Tanto los datos de SEC como los de RP indicaron diferencias insignificantes entre las sustancias de las ejecuciones experimentales y la ejecución de control, lo que indica que ambas ejecuciones experimentales produjeron la sustancia farmacológica con porcentajes pico principales de SEC y RP comparables a la sustancia farmacológica de la ejecución de control. Estos datos demostraron la viabilidad de la utilización de cualquiera de las ejecuciones experimentales en lugar de los procesos de control de UFDF doble, ya que no se identificaron diferencias apreciables en la pureza.

TABLA 11: Resultados de SEC-HPLC y RP-HPLC

Lote de DS	% de Pico Principal de SEC	% de Pico Principal de RP
Experimental 1; UFD FDF	98	99
Experimental 2; UFDF	98	99
Control	98	99

Actividad

La Tabla 12 detalla la actividad (U/ml) y la actividad específica (U/mg); la concentración (mg/ml) se determinó dividiendo la absorbancia (AU) por el coeficiente de extinción conocido de 0,67. Aunque se observó que la Ejecución Experimental 1 (UFD FDF) producía el valor de actividad específica más bajo, también estaba dentro del intervalo de especificación deseado de 50-140 U/mg. La Ejecución Experimental 2 (UFDF) produjo una actividad específica comparable a la ejecución de control. Las tres ejecuciones, dos experimentales y una de control, fueron comparables, lo que indica que el método para obtener la sustancia farmacológica formulada no afecta a la actividad de la sustancia farmacológica.

TABLA 12: Actividad y resultados de actividad específicos

Lote de DS	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ml)	Actividad Específica (U/mg)
Viabilidad 1; UFD FDF	2683	38.7	69.3
Viabilidad 2; UFDF	3320	39.5	84.1
Control	3658	40.4	90.5

Western de Proteína de Célula Huésped (HCP) Western y SDS-PAGE (Coomassie)

Las Figuras 5 y 6 presentan imágenes de SDS-PAGE/transferencia Western HCP y gel SDS-PAGE (Coomassie), respectivamente. Como se observa en la Figura 5, las muestras de ejecuciones experimentales (viabilidad) y de control (Pistas 5, 7, 9) mostraron patrones de banda similares al estándar de referencia (Pista 3), lo que indica que la sustancia farmacológica de todas las ejecuciones mostró niveles comparativamente bajos de HCP. La Figura 6 también demostró la comparabilidad entre las ejecuciones experimentales (viabilidad) y de control con el estándar de referencia; no se detectaron patrones de banda adicionales a través de SDS-PAGE (Coomassie). Estos datos indicaron que la calidad del producto de la sustancia farmacológica de las condiciones de ejecución experimentales fue comparable a la de la ejecución de control en base a los análisis de SDS-PAGE/transferencia Western HCP y SDS-PAGE (Coomassie). No se observaron bandas HCP mayores que la intensidad de la banda HCP de 15 kDa del control en la transferencia Western HCP; y no se observaron nuevas bandas mayores que la intensidad del control de ensayo al 1%.

Mapeo de Glicanos

La Tabla 13 presenta un mapa de glicanos ejemplar. Se encontró que todas las formas glicosiladas estaban presentes a niveles similares en todas las muestras analizadas. Los resultados indicaron que la calidad de producto de la sustancia farmacológica de las pruebas experimentales (viabilidad) fue comparable a la de la sustancia farmacológica de la ejecución de control.

TABLA 13: Resultados del mapa de Glicanos

Forma	Grupo Pico
Neutra	1
1-SA	2
M6P protegida	3
2-SA	4
1-M6P	5
Híbrida	6
2-M6P	7

Análisis de Metales y pH

También se realizó un análisis de metales en las sustancias farmacológicas (DS) producidas experimentalmente y de control para determinar el nivel de fosfato residual. La Tabla 14 presenta el fósforo residual y el pH final de cada muestra de fármaco. Se descubrió que el fósforo residual era comparable en todas las condiciones de ejecución. También se descubrió que el pH era similar independientemente de las condiciones de ejecución. Se planteó la hipótesis de que el fosfato residual contribuía a mantener el pH de la sustancia farmacológica, y los resultados del fósforo residual eran consistentes con la observación de que se mantenía el pH de los tres lotes de sustancias farmacológicas. Estos datos indicaron que ambas ejecuciones experimentales (viabilidad) producen niveles similares de fosfato residual en la sustancia farmacológica a los de la ejecución de control, y los tres lotes de sustancias farmacológicas pudieron mantener el pH objetivo de aproximadamente 6,0 (es decir, 5,5-6,5) en la formulación final.

El análisis de metales también detectó niveles elevados de calcio, como se muestra en la Tabla 14. Los niveles de calcio fueron bastante consistentes en todas las muestras. Investigaciones anteriores habían demostrado que los iones de calcio están presentes en el sitio activo de la rHASA, que es importante para la actividad enzimática.

TABLA 14: Resultados residuales de fósforo, calcio y pH

Lote de DS	Fosforo (ppm)	Calcio (ppm)	pH
Viabilidad 1; UDFDF	29	11	6.2
Viabilidad 2; UDFD	31	10	6.1
Control	33	11	6.2

Mapeo de péptidos

Se realizó un análisis de mapeo de péptidos. De nuevo, todas las muestras produjeron perfiles similares, lo que sugiere que las condiciones de ejecución probadas producen un mapa de péptido de rhASA comparable al del control.

Conclusión

Los experimentos anteriores evaluaron la viabilidad de la filtración viral antes de las operaciones de UFDF mediante el ajuste del pH del eluato de SP, la viabilidad de un único paso de UFDF para reemplazar dos pasos de UFDF y la viabilidad de una única diafiltración (frente a filtración doble) dentro del paso de UFDF de filtración post-viral.

El alto rendimiento de los pasos para la operación de la unidad de filtración viral en las ejecuciones de viabilidad experimentales demostró la viabilidad de la filtración viral antes de las operaciones de UFDF. Como el filtrado viral permitió el pase de la molécula de rhASA al filtrado, se realizaron dos ejecuciones de viabilidad de UFDF. Como todas las métricas de calidad del producto y rendimiento del proceso indicaron la comparabilidad de ambas ejecuciones de viabilidad con el control, se ha determinado que un único paso de UFDF es factible. Los resultados también demostraron la viabilidad de la diafiltración única directamente en la solución de formulación final (solución salina al 0,9%) (prueba de viabilidad experimental 2) ya que el proceso es capaz de producir una sustancia farmacológica de calidad comparable producida tanto por el experimento de control como por el de doble diafiltración (ejecución de viabilidad experimental 1).

En base a estos datos, se ha determinado que un ajuste de pH a aproximadamente 6,0 utilizando, por ejemplo, la formulación de tampón contenida en la Tabla 4, producirá un eluato de SP con pH ajustado adecuado para filtración viral antes de las operaciones finales de UFDF. Este proceso, ejemplificado en la Figura 2, ha demostrado que es un reemplazo factible para procesos que comprenden un paso de UFDF, seguido de filtración viral, seguido de otro paso de UFDF. Se ha demostrado que el proceso de ajuste de pH-filtración viral-UFDF produce sustancias farmacológicas de calidad y pureza comparables a las producidas por procesos más complicados, costosos y que requieren mucho tiempo.

Ejemplo 9. Sustancia farmacológica de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA)

La rhASA purificada de acuerdo con los procesos descritos anteriormente se formuló a 35-45 mg/ml en un tampón de NaCl 154 mM con un pH de aproximadamente 5,5-6,5.

Los mapas de péptidos y glicanos de la sustancia farmacológica final se ajustaban a los descritos en el Ejemplo 8. El ADN residual de la célula huésped estaba presente en cantidades ≤ 100 pg/mg como se determinó mediante el ensayo de ADN THRESHOLD®. La pureza determinada por HPLC de fase inversa y exclusión por tamaño indicó más del 98% y más del 95% de las áreas de pico principal, respectivamente. La transferencia Western indicó que no había bandas de proteína de la célula huésped (HCP) con una intensidad mayor que la intensidad de una banda de HCP de aproximadamente 15 kDa en el control del ensayo. No se detectaron más de tres bandas de HCP. El análisis SDS-PAGE (Coomassie; reducido) se ajustó al estándar de referencia sin nuevas bandas con una intensidad mayor que el 1% del control del ensayo. Se determinó que la actividad específica era de 50-140 U/mg.

Debe entenderse que los artículos "un" y "uno", como se usan en la presente en la especificación, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes plurales. Las descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. Cuando los elementos se presentan como listas en esta descripción (por ejemplo, en el grupo Markush o un formato similar), debe entenderse también se divulga que cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a que la divulgación, o los aspectos de la divulgación, comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones o aspectos consisten, o consisten esencialmente de, tales elementos, características, etc. Por propósitos de simplicidad, esas realizaciones no se han establecido específicamente en la presente en todos los casos con tantas palabras. Las publicaciones, sitios web y otros materiales de referencia a los que se hace referencia en la presente describen los antecedentes de la invención y proporcionan detalles adicionales con respecto a su puesta en práctica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Shire Human Genetic Therapies, Inc.

<120> Métodos para la Purificación de Arilsulfatasa A

<130> 2006685-0433

<140> A ser asignado

<141> 2014-01-09

5

<150> 61/750693

<151> 2013-01-09

<160> 2

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 489

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 1

20	Arg	Pro	Pro	Asn	Ile	Val	Leu	Ile	Phe	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gly	1	5	10	15
25	Asp	Leu	Gly	Cys	Tyr	Gly	His	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Asn	Leu	Asp	20	25	30	
30	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	Thr	Asp	Phe	Tyr	Val	Pro	Val	35	40	45	
35	Ser	Leu	Cys	Thr	Pro	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Leu	Pro	50	55	60	
40	Val	Arg	Met	Gly	Met	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Gly	65	70	75	80
45	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	85	90	95	
50	Gly	Tyr	Leu	Thr	Gly	Met	Ala	Gly	Lys	Trp	His	Leu	Gly	Val	Gly	Pro	100	105	110	
55	Glu	Gly	Ala	Phe	Leu	Pro	Pro	His	Gln	Gly	Phe	His	Arg	Phe	Leu	Gly	115	120	125	
60	Ile	Pro	Tyr	Ser	His	Asp	Gln	Gly	Pro	Cys	Gln	Asn	Leu	Thr	Cys	Phe	130	135	140	
	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Cys	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	145	150	155	160

ES 2 768 261 T3

	Ile	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Val	Glu	Ala	Gln	Pro	Pro	Trp	Leu	
					165					170					175		
5	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Tyr	Met	Ala	Phe	Ala	His	Asp	Leu	Met	Ala	
				180					185					190			
10	Asp	Ala	Gln	Arg	Gln	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ser	His	
			195					200					205				
15	His	Thr	His	Tyr	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg	Ser	
		210					215					220					
20	Gly	Arg	Gly	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Met	Glu	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	
	225					230					235					240	
25	Gly	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Ile	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu	Glu	Thr	
					245					250					255		
30	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu	Thr	Met	Arg	Met	Ser	
				260					265					270			
35	Arg	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Cys	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	
			275					280					285				
40	Glu	Gly	Gly	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Phe	Trp	Pro	Gly	His	Ile	
		290					295					300					
45	Ala	Pro	Gly	Val	Thr	His	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Leu	Pro	
	305					310					315					320	
50	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Asn	Val	Thr	Leu	Asp	
					325					330					335		
55	Gly	Phe	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	Pro	Arg	
				340					345					350			
60	Gln	Ser	Leu	Phe	Phe	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Val	Arg	Gly	Val	
			355					360					365				
65	Phe	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ala	His	Phe	Phe	Thr	Gln	Gly	
		370					375					380					
70	Ser	Ala	His	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Cys	His	Ala	Ser	Ser	
	385					390					395					400	
75	Ser	Leu	Thr	Ala	His	Glu	Pro	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Lys	Asp	

ES 2 768 261 T3

	405	410	415
5	Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro 420 425 430		
10	Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu 435 440 445		
15	Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp 450 455 460		
20	Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala 465 470 475 480		
	Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala 485		
25	<210> 2 <211> 507 <212> PRT <213> Homo sapiens		
30	<400> 2		

ES 2 768 261 T3

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

ES 2 768 261 T3

	130					135						140					
5	Leu 145	Gly	Ile	Pro	Tyr	Ser 150	His	Asp	Gln	Gly	Pro 155	Cys	Gln	Asn	Leu	Thr 160	
10	Cys	Phe	Pro	Pro	Ala 165	Thr	Pro	Cys	Asp	Gly 170	Gly	Cys	Asp	Gln	Gly 175	Leu	
15	Val	Pro	Ile	Pro 180	Leu	Leu	Ala	Asn	Leu 185	Ser	Val	Glu	Ala	Gln 190	Pro	Pro	
20	Trp	Leu	Pro 195	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg 200	Tyr	Met	Ala	Phe	Ala 205	His	Asp	Leu	
25	Met 210	Ala	Asp	Ala	Gln	Arg	Gln 215	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe 220	Leu	Tyr	Tyr	Ala	
30	Ser 225	His	His	Thr	His	Tyr 230	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly 235	Gln	Ser	Phe	Ala	Glu 240	
35	Arg	Ser	Gly	Arg	Gly 245	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser 250	Leu	Met	Glu	Leu	Asp 255	Ala	
40	Ala	Val	Gly	Thr 260	Leu	Met	Thr	Ala	Ile 265	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu 270	Leu	Glu	
45	Glu	Thr	Leu 275	Val	Ile	Phe	Thr	Ala 280	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu 285	Thr	Met	Arg	
50	Met 290	Ser	Arg	Gly	Gly	Cys 295	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Cys 300	Gly	Lys	Gly	Thr	
55	Thr 305	Tyr	Glu	Gly	Gly	Val 310	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu 315	Ala	Phe	Trp	Pro	Gly 320	
60	His	Ile	Ala	Pro	Gly 325	Val	Thr	His	Glu	Leu 330	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp 335	Leu	
65	Leu	Pro	Thr	Leu 340	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly 345	Ala	Pro	Leu	Pro	Asn 350	Val	Thr	
	Leu	Asp	Gly 355	Phe	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr 365	Gly	Lys	Ser	
	Pro	Arg 370	Gln	Ser	Leu	Phe 375	Phe	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Pro 380	Asp	Glu	Val	Arg	

ES 2 768 261 T3

	Gly	Val	Phe	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ala	His	Phe	Phe	Thr	385	390	395	400
5	Gln	Gly	Ser	Ala	His	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Cys	His	Ala	405	410	415	
10	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	His	Glu	Pro	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	420	425	430	
15	Lys	Asp	Pro	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	435	440	445	
20	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Lys	Ala	450	455	460	
25	Gln	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	465	470	475	480
30	Glu	Asp	Pro	Ala	Leu	Gln	Ile	Cys	Cys	His	Pro	Gly	Cys	Thr	Pro	Arg	485	490	495	
35	Pro	Ala	Cys	Cys	His	Cys	Pro	Asp	Pro	His	Ala						500	505		

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante, el método comprendiendo purificar la proteína arilsulfatasa A (ASA) recombinante a partir de una preparación impura realizando uno o más pasos de cromatografía; agrupar el eluato de uno o más pasos de cromatografía; ajustar el pH del eluato agrupado a un pH de 5,8-7,0; y someter el eluato con pH ajustado después de uno o más pasos de cromatografía a un único paso de (i) ultrafiltración, (ii) diafiltración, o (iii) ultrafiltración/diafiltración combinadas, intercambiando de este modo la proteína ASA recombinante directamente en el tampón de formulación final.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - (a) el pH se ajusta a aproximadamente 6,0, y/o
 - (b) el pH se ajusta usando un tampón que comprende fosfato de sodio, cloruro de sodio y citrato de sodio con un pH 7,0, opcionalmente en donde el tampón comprende aproximadamente 0,1-0,5 M de fosfato de sodio, 0,5-2,5 M de cloruro de sodio y 0,1-0,6 M de citrato de sodio con pH 7,0.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde se realiza una filtración viral antes del paso de ultrafiltración y diafiltración.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el único paso de (i) ultrafiltración, (ii) diafiltración o (iii) ultrafiltración/diafiltración combinadas comprende solo una diafiltración.
5. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la ultrafiltración es ultrafiltración de flujo tangencial.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno o más pasos de cromatografía comprenden una cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente en donde la cromatografía de intercambio catiónico es el último paso de cromatografía y el eluato de la cromatografía de intercambio catiónico se agrupa antes de ajustar el pH, opcionalmente en donde una o más de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto y cromatografía de interacción hidrófoba se llevan a cabo antes de realizar la cromatografía de intercambio catiónico.
7. El método de la reivindicación 6, en donde: la cromatografía de intercambio aniónico (a) es cromatografía Q, o (b) comprende una resina TMAE, opcionalmente en donde
 - (i) la resina TMAE, una vez cargada con la preparación impura, se lava con un primer tampón de lavado que comprende MES-Tris con pH 7,0, opcionalmente en donde el primer tampón de lavado comprende aproximadamente 20-75 mM de MES-Tris, y/o
 - (ii) la resina TMAE se lava con un segundo tampón de lavado que comprende MES-Tris y NaCl con pH 7,0, opcionalmente en donde el segundo tampón de lavado comprende aproximadamente 5-75 mM de MES-Tris y aproximadamente 50-150 mM de NaCl con pH 7,0 y/o
 - (iii) la resina TMAE, una vez cargada con la preparación impura, se eluye usando un tampón de elución que comprende MES-Tris y NaCl con pH 7,0 opcionalmente en donde el tampón de elución comprende aproximadamente 5-75 mM de MES-Tris y aproximadamente 150-300 mM de NaCl con pH 7,0.
8. El método de la reivindicación 6, en donde
 - (a) la cromatografía de intercambio aniónico utiliza una columna seleccionada del grupo que consiste de Q Sepharose™ Fast Flow, Q Sepharose™ High Performance, Q Sepharose™ XL, Capto™ Q, DEAE, TOYOPEARL GigaCap® Q, Fractogel® TMAE, Eshmuno™ Q, Nuvia™ Q o UNOsphere™ Q,
 - (b) la cromatografía de modo mixto es cromatografía de hidroxapatita (HA), y/o
 - (c) la cromatografía de interacción hidrófoba es cromatografía de fenilo.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde:
 - (a) realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar una cromatografía de intercambio aniónico con resina TMAE, cromatografía de HA, cromatografía de fenilo y cromatografía de SP de intercambio catiónico, en ese orden, y/o
 - (b) la cromatografía de intercambio aniónico comprende usar una columna con una capacidad de carga mayor que aproximadamente 4,5 g/l, opcionalmente en donde la capacidad de carga de la columna es de aproximadamente 5-20 g/l.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso de ultrafiltración usa un filtro de

membrana que comprende un tamaño de poro con un límite de peso molecular de por lo menos 10, por lo menos 30 o por lo menos 50 kDA.

5 **11.** El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la ultrafiltración comprende una membrana de polietersulfona o celulosa.

10 **12.** El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la ultrafiltración es seguida por uno o más pasos de filtración en profundidad y/o inactivación viral, opcionalmente en donde un paso de inactivación viral comprende añadir un detergente a la preparación impura.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

15 (a) la proteína ASA recombinante es producida por células de mamífero cultivadas en suspensión, opcionalmente en donde las células de mamífero se cultivan en un biorreactor y/o en donde el medio está libre de suero, opcionalmente en donde el medio libre de suero es un medio definido químicamente y/o las células de mamífero son células humanas,

(b) la preparación impura es una corriente de alimentación de un biorreactor de perfusión,

20 (c) la preparación impura se prepara a partir del medio libre de suero que contiene proteína ASA recombinante secretada por las células de mamífero, opcionalmente en donde la preparación impura se descongela de una preparación de medio congelado, y/o

(d) la proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 70% idéntica a la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la proteína ASA humana de tipo salvaje, opcionalmente en donde la proteína ASA recombinante tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1,

25 **14.** El método de la reivindicación 1, en donde el primer paso de cromatografía usa una columna con una capacidad de carga de más de aproximadamente 4,5 g de proteína/l de resina, opcionalmente en donde el paso de realizar uno o más pasos de cromatografía comprende realizar cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico, en ese orden, opcionalmente en donde la cromatografía de intercambio aniónico usa una columna con resina TMAE, opcionalmente en donde la columna TMAE tiene una capacidad de carga de aproximadamente 5-20 g de proteína/l de resina.

30

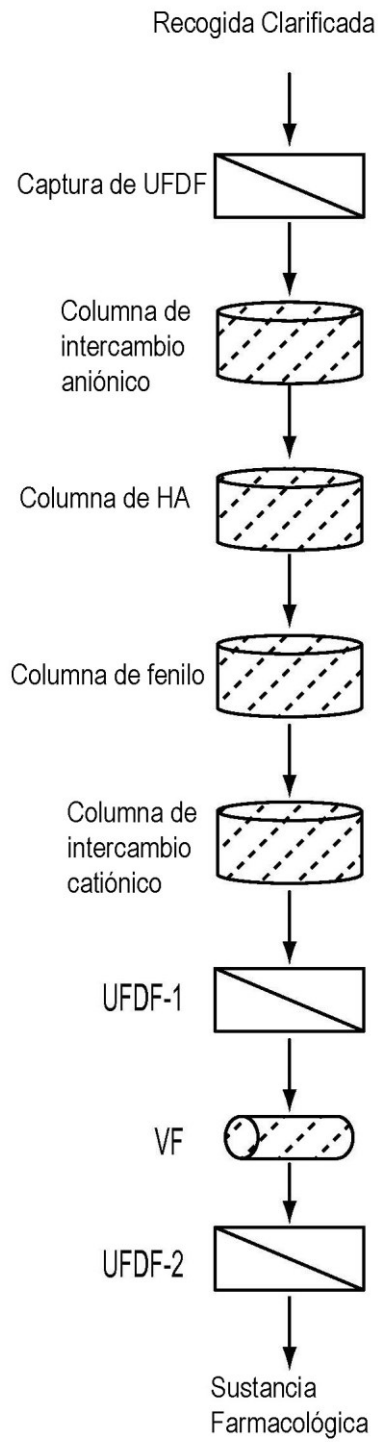


FIG. 1

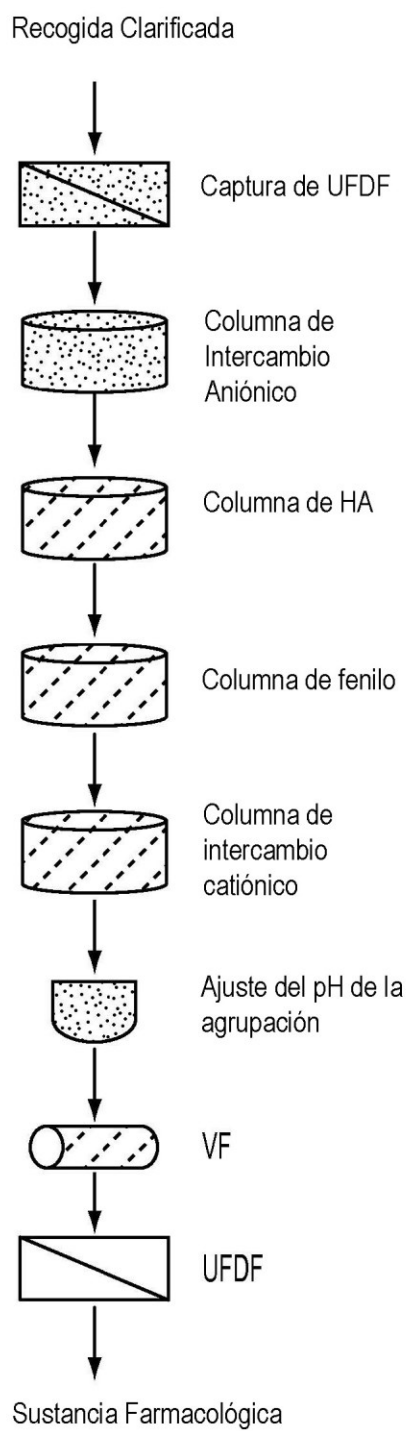


FIG. 2

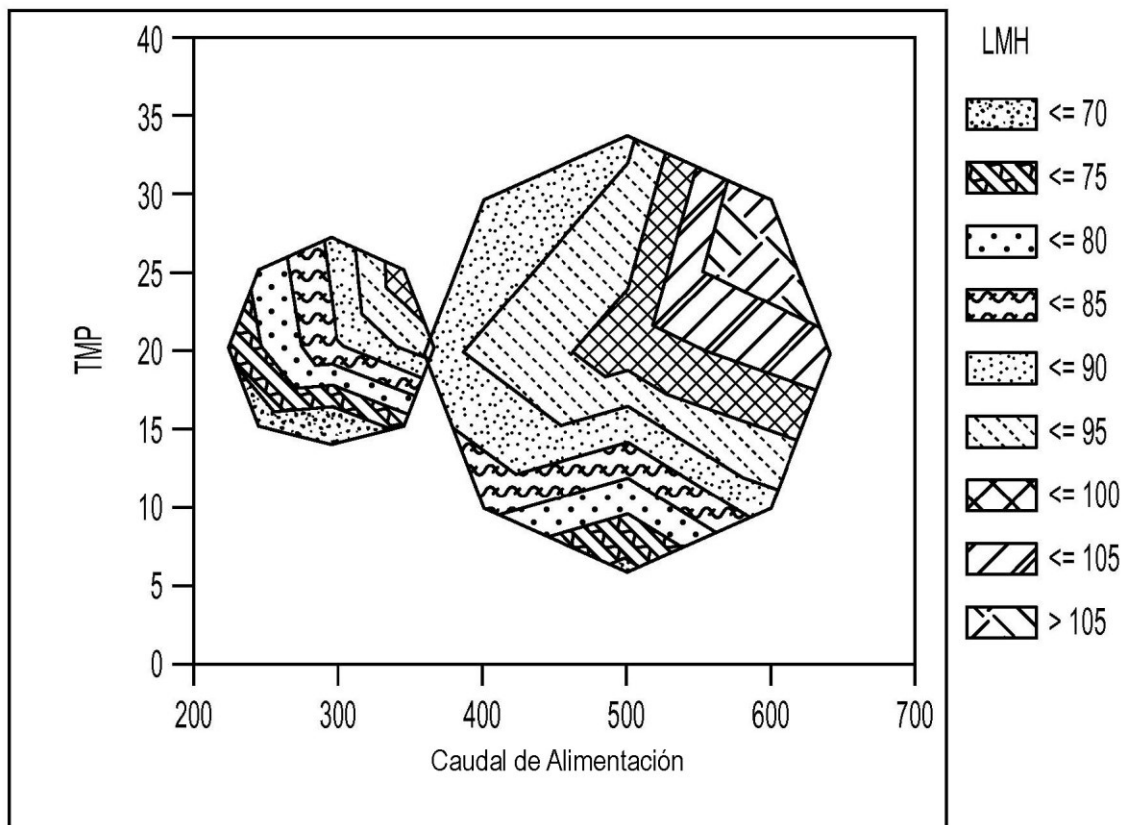


FIG. 3

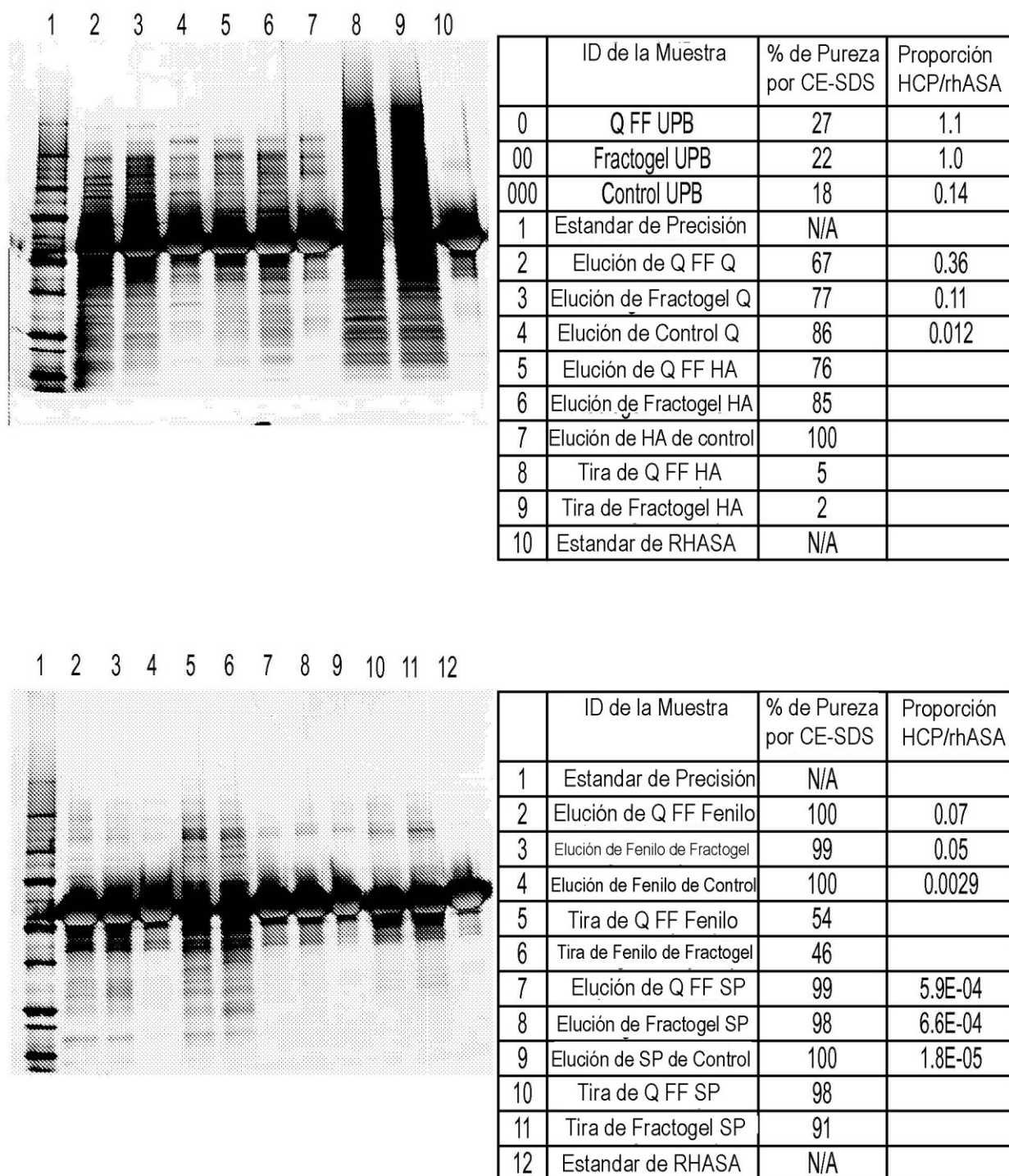


FIG. 4

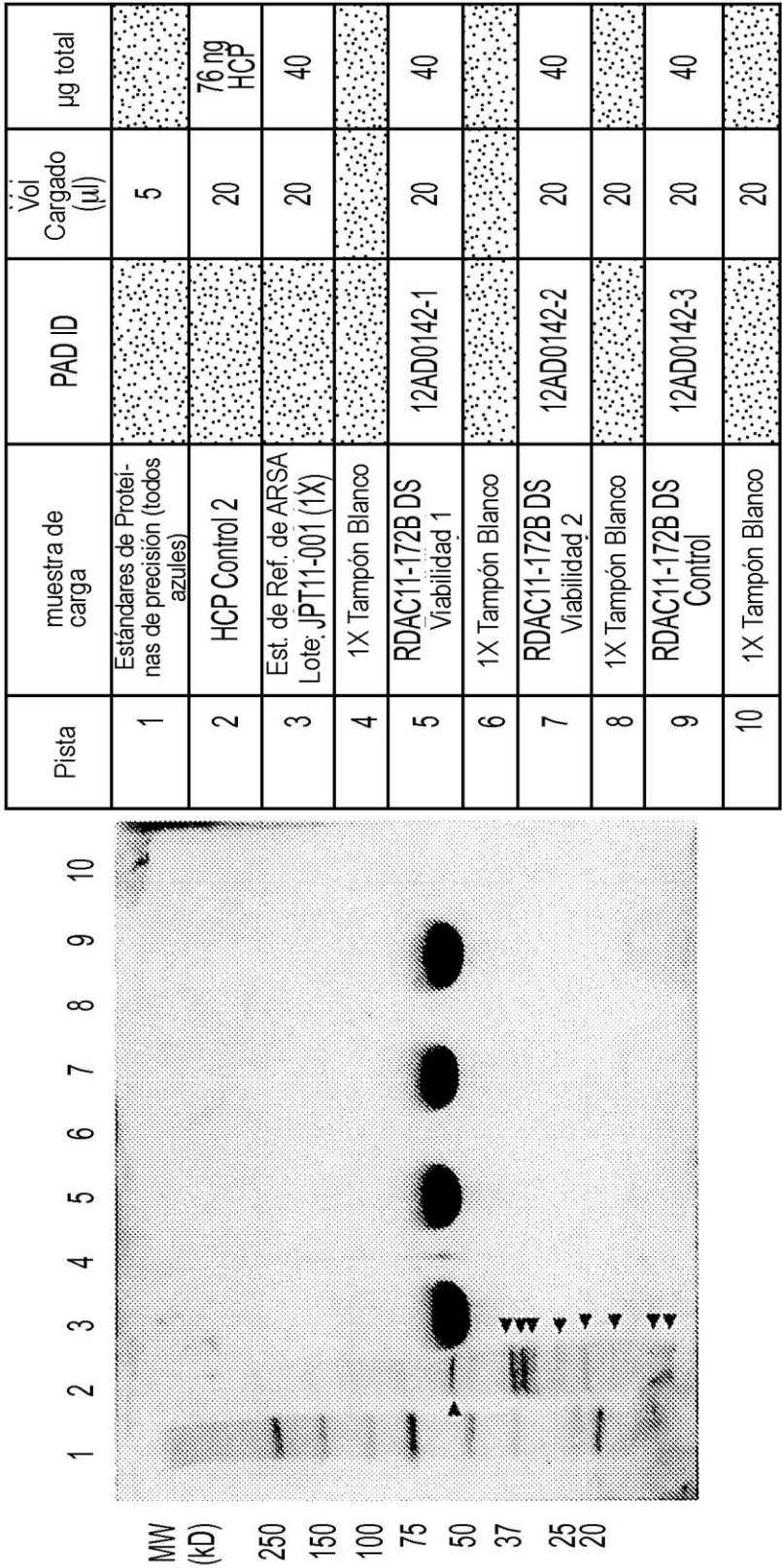


FIG. 5

Pista	muestra de carga	PAD ID	vol. de carga pl	pg total
/	Estándares de Precisión más Proteínas (sin tinción)		10pl	
2	Control de Ensayo Nº 1 (0,5%)		20	50 ng cada 13-lac y Ref.
3	Control de Ensayo Nº 2 (1%)		20	100 ng cada, 13-lac y Ref.
4	Estándar de Referencia 5,2 mg/ml	Lote Nº RS- JPT11-001	20	10
5	RDAC11-172 B DS Viabilidad 1	12AD0142	20	10
6	RDAC11-172 E DS Viabilidad 2	12AD0142	20	10
7	RDAC11-172 B DS Control	12AD0142	20	10
8	Tampón Blanco		20	
9	Tampón Blanco		20	
10	Tampón Blanco		20	

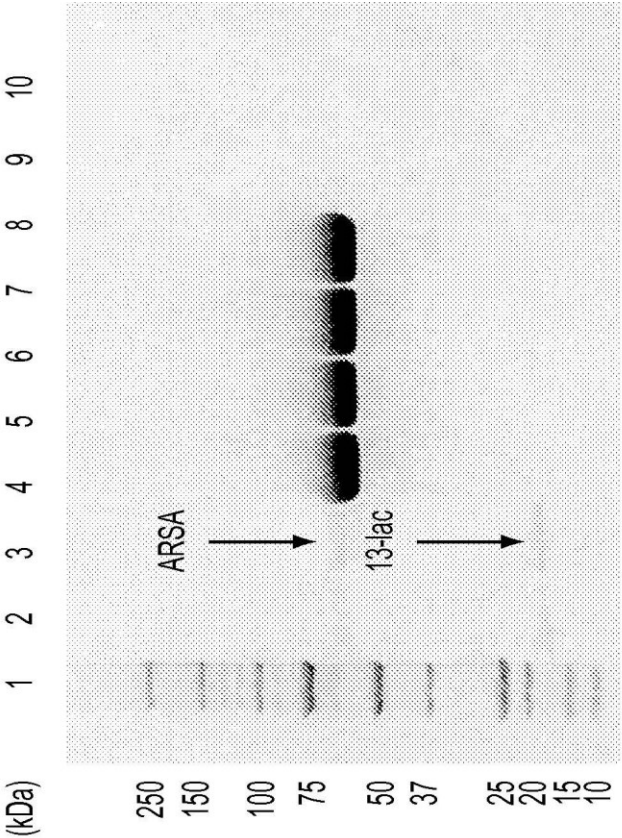


FIG. 6