

NUEVO PROCESO PARA PURIFICAR LA HEPARÁN-N-SULFATASA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un nuevo método para purificar heparán-N-sulfatasa (HNS) capaz de reducir en gran medida el contenido de impurezas y mejorar en gran medida la estabilidad de la heparán-N-sulfatasa, una composición farmacéutica que comprende heparán-N-sulfatasa preparada mediante el método y un método para tratar el síndrome de Sanfilippo utilizando la misma.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las mucopolisacaridosis (MPS) son enfermedades de almacenamiento lisosomal hereditarias raras causadas por la falta o deficiencia de ciertas enzimas lisosomales.

Las personas normales con una expresión normal de enzimas lisosomales convierten las moléculas de polisacáridos en sustancias utilizables *in vivo* mediante un proceso metabólico por enzimas lisosomales. Sin embargo, los pacientes con falta o deficiencia de enzimas lisosomales sufren diversos tipos de enfermedades debido a la acumulación de moléculas de polisacáridos en células, tejidos y orgánulos llamados lisosomas.

El síndrome de Sanfilippo, que recibe su nombre del médico estadounidense "Sanfilippo", que descubrió la enfermedad en 1963, es un tipo de mucopolisacaridosis. El síndrome de Sanfilippo es una enfermedad genética autosómica recesiva conocida como MPS III y se caracteriza por no presentar opacidad corneal clínicamente y presentar cambios físicos leves como hepatoesplenomegalia o cambios en el sistema esquelético, pero síntomas muy graves y progresivos en el sistema nervioso central.

El síndrome de Sanfilippo es causado por la deficiencia de cuatro enzimas diferentes necesarias para degradar polisacáridos, especialmente glicosaminoglicanos (GAG) y se divide en MPS IIIA (Sanfilippo A), MPS IIIB (Sanfilippo B), MPS IIIC (Sanfilippo C) y MPS IIID (Sanfilippo D) dependiendo de las enzimas deficientes. Las enzimas deficientes y el locus del mapa genético de cada síndrome de Sanfilippo son los siguientes.

Tipo A (MPS IIIA): heparán N-sulfatasa - cromosoma 17 (17q25.3)

Tipo B (MPS IIIB): N-acetil- α -D-glucosaminidasa - cromosoma 17 (17q21)

Tipo C (MPS IIIC): acetil-CoA: α -glucosaminida-N-acetiltransferasa - cromosoma 14

Tipo D (MPS IIID): N-acetil- α -D-glucosaminida-6-sulfatasa - cromosoma 12 (12q14)

Como se puede observar en lo anterior, MPS IIIA es causado por una deficiencia de heparán-N-sulfatasa, que es una enzima involucrada en la degradación del heparán sulfato e hidroliza la fracción sulfato unida al grupo amino del residuo de glucosamina. Los síntomas de MPS IIIA (Sanfilippo A) suelen aparecer entre los 2 y los 6 años, pero pueden diagnosticarse después de los 13 años. En general, se sabe que los pacientes con MPS IIIA tienen un retraso significativo en el desarrollo y dificultad para sobrevivir a largo plazo.

Actualmente, no existe una terapia aprobada para el MPS IIIA, sino que solo se está llevando a cabo una terapia sintomática para el alivio sintomático. Se espera que la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés), es decir, una terapia que consiste en administrar heparán-N-sulfatasa preparada

externamente a pacientes con MPS IIIA, sea muy útil para el tratamiento de MPS IIIA.

Para tratar a los pacientes con MPS IIIA mediante terapia de reemplazo enzimático con heparán-N-sulfatasa, es esencial la producción en masa de heparán-N-sulfatasa y se requieren procesos de cultivo y separación/purificación de células recombinantes para la producción en masa.

Se han desarrollado procesos de separación y purificación que incluyen cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), también conocida como cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (MCAC, por sus siglas en inglés), cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés) para la separación y purificación de la heparán-N-sulfatasa producida de forma recombinante (ver patente coreana No. 2,286.260).

Además, se han desarrollado procesos de separación y purificación que incluyen cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés), cromatografía de hidroxiapatita (HA) y cromatografía de intercambio catiónico (CEX) (ver publicación de patente estadounidense No. 2012/0329133).

Sin embargo, los procesos convencionales aún presentan problemas de baja estabilidad de la heparán-N-sulfatasa durante el proceso de purificación y deterioro en la calidad y seguridad de la heparán-N-sulfatasa finalmente producida debido a la eliminación insuficiente de HCP (proteínas de la célula huésped) y otras impurezas formadas durante la producción de heparán-N-sulfatasa utilizando células recombinantes. Todavía existe una necesidad urgente de un nuevo proceso de separación/purificación de heparán-N-sulfatasa que sea capaz de resolver estos problemas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para resolver los problemas del proceso convencional de separación y purificación de heparán-N-sulfatasa, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método y proceso para purificar heparán-N-sulfatasa capaz de minimizar el deterioro en la estabilidad de heparán-N-sulfatasa y eliminar en gran medida HCP y otras impurezas durante el proceso de separación y purificación, una composición farmacéutica que comprende heparán-N-sulfatasa preparada por el método y un método para tratar el síndrome de Sanfilippo utilizando la misma.

Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona un método para purificar heparán-N-sulfatasa a partir de una solución que contiene heparán-N-sulfatasa que incluye al menos una impureza, el método comprende realizar una cromatografía multimodo (MMC, por sus siglas en inglés) para obtener un eluato; y realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante.

La heparán-N-sulfatasa es una enzima lisosomal conocida en la técnica como N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH; EC 3.10.1.1); N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa; 2-desoxi-D-glucósido-2-sulfamato sulfohidrolasa (sulfamato sulfohidrolasa); heparina sulfamidasa; sulfoglucosamina sulfamidasa; sulfamidasa; y HNS, rhHNS, sulfamidasa, rhNS y rhSGSH, y se deriva particularmente preferiblemente de seres humanos.

En la presente invención, la heparán-N-sulfatasa humana tiene una secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se eliminan en el extremo N y/o el extremo C en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mientras que tiene la actividad de heparán-N-sulfatasa, y en particular, se interpreta que tiene una secuencia que tiene una homología de secuencia de 90% o más, preferiblemente 95% o más, más preferiblemente 99% o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o la secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se eliminan en el extremo N y/o el extremo C en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Secuencia de aminoácidos de heparán-N-sulfatasa humana

(SEQ ID NO: 1)

```

MSCPVPACCA LLLVLGLCRA RPRNALLLLA DDGGFESGAY NNSAIATPHL
DALARRSLLF RNAFTSVSSC SPSRASLLTG LPQHONGMYG LHQDVHHFNS
FDKVRSLPLL LSQAGVRTGI IGKKHVGPEP VYPFDFAYTE ENGSVLQVGR
NITRIKLLVR KFLQTQDDRP FFLYVAFHDP HRCGHSQPQY GTFCEKFGNG
ESGMGRIPDW TPQAYDPLDV LVPYFVPNTP AARADLAAQY TTVGRMDQGV
GLVLQELRDA GVLNDTLVIF TSDNGIPFPS GRTNLYWPGT AEPLLVSSE
HPKRWGQVSE AYVSLDLTP TILDWFSIPY PSYAIFGSKT IHLTGRSLLP
ALEAEPLWAT VFGSQSHHEV TMSYPMRVQ HRHFRVHNL NFKMPFPIDQ
DFYVSPTFQD LLNRTTAGQP TGWYKDLRHY YYRARWELYD RSRDPHETQN
LATDPRFAQL LEMLRDQLAK WQWETHDPWV CAPDGVLEEK LSPQCQPLHN EL

```

La solución que comprende heparán-N-sulfatasa que incluye una o más impurezas es preferiblemente, pero no se limita a, una solución de cultivo celular, en donde la solución de cultivo celular es una solución de cultivo de células huésped capaces de producir de manera recombinante heparán-N-sulfatasa.

Las células huésped pueden ser cualquier célula huésped conocida en la técnica, y los ejemplos de las células huésped incluyen, pero no se limitan a, cepas del género *Bacillus*, tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, células huésped procariontes tales como *Streptomyces*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas putida*), *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus carnosus*), hongos tales como especies de *Aspergillus*, levaduras tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces* y *Neurospora crassa*, otras células eucariotas inferiores, células eucariotas superiores tales como células derivadas de insectos y células derivadas de plantas o mamíferos.

Preferiblemente, las células huésped pueden ser células de riñón de mono (COS7), células NSO, SP2/0, células de ovario de hámster chino (CHO), W138, células de riñón de hámster bebé (BHK), MDCK, células de la línea celular de mieloma, células HuT 78 o células 293.

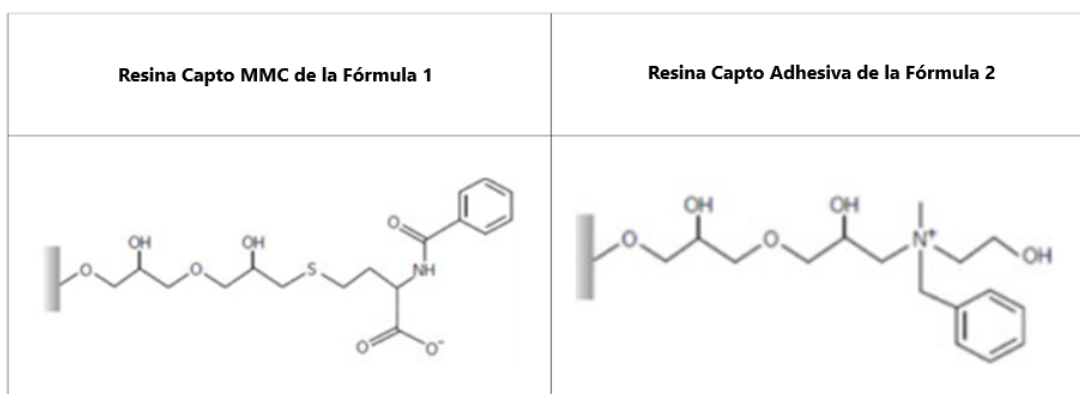
Además, la solución de cultivo celular se puede clarificar eliminando células y restos celulares mediante filtración profunda o similar.

En la presente invención, la cromatografía multimodo se puede implementar realizando

simultáneamente cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), pero no se limita a esto.

Mediante cromatografía multimodo se pueden eliminar diversas impurezas. En particular, es posible la elución selectiva de enzimas con diferentes contenidos de M6P (manosa-6-fosfato), y se puede mejorar la pureza de la heparán-N-sulfatasa purificada final y aumentar notablemente su estabilidad eliminando impurezas con propiedades similares a las de la heparán-N-sulfatasa.

En la presente invención, la resina para la cromatografía multimodo se puede utilizar sin limitación siempre que sea aplicable a la cromatografía de intercambio catiónico y a la cromatografía de interacción hidrofóbica simultáneamente. Por ejemplo, se pueden utilizar resinas Capto MMC y Capto Adhesiva que tienen una estructura de la Fórmula 1 y la Fórmula 2, pero no se limitan a ellas.



Al realizar la cromatografía multimodo según la presente invención, el pH del tampón (solución) para carga y equilibrio es 4.5 ± 1.0 , preferiblemente 4.5 ± 0.5 y más preferiblemente 4.5 ± 0.1 , pero no se limita a esto.

El tampón contiene 200 ± 100 mM, preferiblemente 200 ± 50 mM, más preferiblemente 200 ± 20 mM de NaCl, y es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de acetato, fosfato, citrato, histidina, glicina o tampón Tris convencional, o similares sin limitación, pero no se limita a lo mismo.

En la etapa de realización de la cromatografía multimodo según la presente invención, el tampón para lavado y elución después de que la resina se une a la heparán-N-sulfatasa es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de tampón convencional de histidina, glicina, acetato, fosfato, citrato o Tris, o similares, pero no se limita a ellos.

El pH del tampón utilizado en la etapa de lavado puede ser de 5.0 a 8.0, preferiblemente de 6.0 a 7.5, más preferiblemente de 6.3 a 7.0.

En particular, el lavado según la presente invención puede comprender dos o más etapas de lavado. En este caso, el pH del tampón utilizado en la etapa de lavado posterior puede ser mayor que el del tampón utilizado en la etapa de lavado principal.

Específicamente, cuando el lavado comprende dos etapas de lavado, el pH de la primera etapa de lavado es de 6.0 a 6.6, preferiblemente de 6.2 a 6.6, más preferiblemente de 6.4 a 6.5, y el pH de la

segunda etapa de lavado es de 6.6 a 7,2, preferiblemente de 6.7 a 7.0, más preferiblemente de 6.75 a 6.9, pero no se limita a esto.

Además, el pH del tampón utilizado en la etapa de elución puede ser de 6.6 a 9,0, preferiblemente de 6.9 a 8.8, más preferiblemente de 8.0 a 8.4, pero no está limitado a esto.

5 La etapa de realizar la precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante según la presente invención tiene el efecto de aumentar la eficiencia de eliminación de impurezas al eliminar de manera eficiente HCP que tiene un pH relativamente bajo.

10 La precipitación de caprilato se realiza añadiendo ácido caprílico o una sal del mismo, preferiblemente caprilato de sodio, a una solución objetivo, en un ejemplo específico, a un eluato de cromatografía multimodo o un eluato de cromatografía de afinidad para obtener una concentración de 1 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 30 mM, más preferiblemente de 8 a 12 mM, a un pH de 3.5 a 6.0, preferiblemente de 4.0 a 5.5, más preferiblemente de 4.3 a 5.0.

15 El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención, entre la realización de una cromatografía multimodo para obtener un eluato y la realización de una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante, comprende, además, la realización de una cromatografía de afinidad para obtener un eluato.

Por lo tanto, el método puede comprender realizar una cromatografía multimodo para obtener un eluato; realizar una cromatografía de afinidad para obtener un eluato; y realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante.

20 La etapa de utilizar la cromatografía de afinidad según la presente invención comprende eliminar impurezas, en particular, HCP como la catepsina X, que tiene propiedades físicas y químicas similares como pI (punto isoeléctrico) o hidrofobicidad a la heparán-N-sulfatasa, para mejorar el efecto de eliminación de impurezas.

25 La resina utilizada para la cromatografía de afinidad según la presente invención es preferiblemente heparina sefarosa o sefarosa azul, pero no se limita a ellas.

El pH del tampón (solución) utilizado para la carga, el equilibrio, el lavado y la elución puede ser de 4.5 ± 1.0 , preferiblemente de 4.5 ± 0.5 , más preferiblemente de 4.5 ± 0.1 , pero no se limita a ello, y el tampón es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de acetato convencional, fosfato, citrato, histidina, glicina o tampón Tris, o similares, sin limitación, pero no se limita a ello.

30 En particular, el tampón utilizado para el lavado puede contener 150 ± 100 mM, preferiblemente 150 ± 50 mM, más preferiblemente 150 ± 20 mM de NaCl, y el tampón utilizado para la elución puede contener 300 ± 100 mM, preferiblemente 300 ± 50 mM, más preferiblemente 300 ± 20 mM de NaCl.

35 El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención, antes de realizar una cromatografía multimodo para obtener un eluato, puede comprender, además, realizar una cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato, un tratamiento con disolvente/detergente y realizar una cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para obtener un eluato.

Por lo tanto, el método puede comprender realizar una cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato; un tratamiento con disolvente/detergente; realizar una cromatografía

de intercambio catiónico (CEX) para obtener un eluato; realizar una cromatografía multimodo para obtener un eluato; realizar una cromatografía de afinidad para obtener un eluato; y realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante.

La cromatografía de intercambio aniónico primario es un paso para recuperar al máximo la heparán-N-sulfatasa de la solución de cultivo celular, y la resina utilizada para la cromatografía de intercambio aniónico primario según la presente invención es una resina de intercambio aniónico débil o una resina de intercambio aniónico fuerte, y los ejemplos de la resina incluyen, pero no se limitan a, resinas de aniones débiles tales como DEAE Sepharose, y resinas de aniones fuertes tales como Q Sepharose, Fractogel TMAE (M), Fractogel TMAE (S) y Poros XQ, y similares.

El pH del tampón (solución) para la carga, el equilibrio, el lavado y la elución durante la cromatografía de intercambio aniónico primario según la presente invención es de 7.5 ± 1.0 , preferiblemente de 7.5 ± 0.7 , más preferiblemente de 7.5 ± 0.5 , pero no se limita a ello, y la resina es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 70 mM, más preferiblemente de 40 a 60 mM de tampón convencional Tris, acetato, fosfato, citrato, histidina o glicina, o similar, sin limitación, pero no se limita a ello. Además, el tampón de elución puede contener 200 ± 100 mM, preferiblemente 200 ± 70 mM, y más preferiblemente 200 ± 50 mM de NaCl.

El tratamiento con disolvente/detergente es un paso para inactivar el virus preferiblemente utilizando una combinación de polisorbato, específicamente polisorbato 20 y/o 80, y fosfato de tri-n-butilo (TnBP), pero no se limita a esto.

El tratamiento con disolvente/detergente se realiza a un pH de 7.5 ± 1.0 , preferiblemente 7.5 ± 0.5 , más preferiblemente 7.5 ± 0.2 , a una temperatura de 18 a 28°C, preferiblemente de 20 a 25°C, durante 1 hora o más y 6 horas o menos.

La cromatografía de intercambio catiónico es un proceso para recuperar al máximo la heparán-N-sulfatasa y eliminar impurezas como las relacionadas con el proceso y el HCP formado durante el tratamiento con disolvente/detergente.

La resina utilizada en la cromatografía de intercambio catiónico según la presente invención puede ser una resina de intercambio catiónico débil o una resina de intercambio catiónico fuerte, ejemplos de las cuales incluyen resinas de carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP) y metilsulfonato (S), y la resina es preferiblemente SP Sepharose o similar, pero no se limita a ellas.

El pH del tampón (solución) para carga, equilibrio, lavado y elución durante la cromatografía de intercambio catiónico según la presente invención es de 4.5 ± 0.7 , preferiblemente de 4.5 ± 0.5 , más preferiblemente de 4.5 ± 0.1 , pero no se limita a ello, y la resina es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de tampón convencional de acetato, fosfato, citrato, histidina, glicina o Tris, o similares sin limitación, pero no se limita a ello.

Además, el tampón para carga o equilibrio puede contener 100 ± 70 mM, preferiblemente 100 ± 50 mM, más preferiblemente 100 ± 20 mM de NaCl, y el tampón de elución puede contener 200 ± 100 mM, preferiblemente 200 ± 50 mM de NaCl, más preferiblemente 200 ± 20 mM de NaCl.

El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención, después de realizar la precipitación con caprilato para obtener un sobrenadante, puede comprender además la realización de una

cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato.

Por lo tanto, el método puede comprender realizar una cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato; un tratamiento con disolvente/detergente; realizar una cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para obtener un eluato; realizar una cromatografía multimodo para obtener un eluato; realizar una cromatografía de afinidad para obtener un eluato; realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante; y realizar una cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato.

La cromatografía de intercambio aniónico secundario es un proceso para recuperar al máximo la heparán-N-sulfatasa y eliminar impurezas relacionadas con el proceso, como heparina, caprilato o disolvente/detergente. La resina utilizada en la cromatografía de intercambio aniónico según la presente invención es preferiblemente una resina de intercambio aniónico fuerte, como Q Sepharose, Fractogel TMAE(M), Fractogel TMAE(S) o Poros XQ, pero no se limita a ellas.

El pH del tampón (solución) para carga, equilibrio, lavado y elución durante la cromatografía de intercambio aniónico secundario según la presente invención es de 7.5 ± 1.0 , preferiblemente de 7.5 ± 0.7 , más preferiblemente de 7.5 ± 0.5 , pero no se limita a ello, y la resina es de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de tampón convencional de histidina, glicina, acetato, fosfato, citrato o Tris o similares, sin limitación, pero no se limita a ello.

Además, el tampón de equilibrio puede contener 50 ± 20 mM, preferiblemente 50 ± 10 mM, más preferiblemente 50 ± 5 mM de NaCl, y el tampón de elución puede contener 150 ± 50 mM, preferiblemente 150 ± 30 mM, más preferiblemente 150 ± 10 mM de NaCl.

El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención, después de realizar una cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato, puede comprender además nanofiltración.

Por lo tanto, el método puede comprender realizar una cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato; un tratamiento con disolvente/detergente; realizar una cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para obtener un eluato; realizar una cromatografía multimodo para obtener un eluato; realizar una cromatografía de afinidad para obtener un eluato; realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante; realizar una cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato; y nanofiltración.

La nanofiltración tiene como objetivo eliminar virus y puede realizarse utilizando un nanofiltro comúnmente utilizado para eliminar virus.

El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención puede comprender además ultrafiltración/diafiltración (UF/DF); al menos un tiempo seleccionado entre los pasos que consisten en antes de realizar una cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato; entre realizar una precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante y realizar una cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato; y después de la nanofiltración.

Por lo tanto, cuando la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) está comprendida en todos los pasos que son antes de realizar la cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato,

entre realizar la precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante y realizar la cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato, y después de la nanofiltración, el método global puede comprender:

ultrafiltración/diafiltración primaria (UF/DF);

realizar cromatografía de intercambio aniónico primario (AEX) para obtener un eluato;

tratamiento con disolventes/detergentes;

realizar cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para obtener un eluato;

realizar cromatografía multimodo para obtener un eluato;

realizar cromatografía de afinidad para obtener un eluato;

realizar precipitación de caprilato para obtener un sobrenadante;

ultrafiltración/diafiltración secundaria (UF/DF);

realizar cromatografía de intercambio aniónico secundario (AEX) para obtener un eluato;

nanofiltración; y

ultrafiltración/diafiltración terciaria (UF/DF).

La ultrafiltración/diafiltración primaria tiene como objetivo concentrar la solución de cultivo celular, preferiblemente la solución de cultivo celular que ha pasado por un proceso de purificación, e intercambiar el tampón para reducir el volumen de la solución de cultivo objetivo, acortar el tiempo de carga de la columna y mejorar la conveniencia del proceso posterior.

El valor de corte de la membrana utilizada en la ultrafiltración/diafiltración primaria puede ser de 10 a 100 kDa, preferiblemente de 20 a 70 kDa, más preferiblemente de 30 a 50 kDa, pero no está limitado a esto.

El pH del tampón utilizado en la ultrafiltración/diafiltración primaria puede ser de 7.5 ± 1.0 , preferiblemente de 7.5 ± 0.7 , más preferiblemente de 7.5 ± 0.5 , pero no se limita a ello, y se utiliza de 5 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 80 mM, más preferiblemente de 30 a 70 mM de tampón convencional Tris, histidina, glicina, acetato, fosfato o citrato, o similares sin limitación, pero no se limita a ello.

La ultrafiltración/diafiltración secundaria se realiza entre la precipitación de caprilato y la cromatografía de intercambio aniónico secundaria y tiene como objetivo convertir el pH y la conductividad.

El valor de corte de la membrana utilizada en la ultrafiltración/diafiltración secundaria puede ser de 10 a 100 kDa, preferiblemente de 20 a 70 kDa, y más preferiblemente de 30 a 50 kDa, pero no está limitado a esto.

El pH del tampón utilizado en la ultrafiltración/diafiltración secundaria puede ser de 7.5 ± 1.0 , preferiblemente de 7.5 ± 0.7 , más preferiblemente de 7.5 ± 0.5 , pero no se limita a ello, y se utiliza de 5 a 50 mM, preferiblemente de 10 a 40 mM, más preferiblemente de 15 a 30 mM de tampón convencional de histidina, glicina, acetato, fosfato, citrato o Tris, o similares sin limitación, pero no se limita a ello.

Cuando la conductividad de la ultrafiltración/diafiltración secundaria es de 10 mS/cm o menos, preferiblemente de 8 mS/cm o menos, y más preferiblemente de 6 mS/cm o menos, se recupera la solución de proceso y se ajusta el pH a 7.5 ± 1.0 .

La ultrafiltración/diafiltración terciaria se realiza después de la nanofiltración y tiene como

objetivo concentrar finalmente el resultado a una alta concentración e intercambiar el tampón.

El valor de corte de la membrana utilizada en la ultrafiltración/diafiltración terciaria puede ser de 10 a 100 kDa, preferiblemente de 20 a 70 kDa, y más preferiblemente de 30 a 50 kDa, pero no está limitado a esto.

El pH del tampón utilizado en la ultrafiltración/diafiltración terciaria puede ser de 8.0 ± 1.0 , preferiblemente de 8.0 ± 0.7 , más preferiblemente de 8.0 ± 0.5 , pero no se limita a ello, y se utiliza de 1 a 20 mM, preferiblemente de 2 a 10 mM, más preferiblemente de 3 a 8 mM de tampón convencional de histidina, glicina, acetato, fosfato, citrato o Tris, o similares sin limitación, pero no se limita a ello.

A menos que se especifique lo contrario, todos los pasos de purificación según la presente invención se realizan a temperatura ambiente, específicamente de 15 a 30°C, preferiblemente de 18 a 25°C.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un cromatograma que ilustra un proceso de purificación de heparán-N-sulfatasa utilizando cromatografía de intercambio aniónico primario.

La Figura 2 muestra el resultado de SDS-PAGE de cada solución escalonada de la cromatografía de intercambio aniónico primario.

La Figura 3 es un cromatograma que ilustra un proceso de purificación de heparán-N-sulfatasa utilizando cromatografía de intercambio catiónico.

La Figura 4 muestra el resultado de SDS-PAGE de cada solución paso a paso de cromatografía de intercambio catiónico.

La Figura 5 es un cromatograma en función del pH del eluato en cromatografía multimodo.

La Figura 6 es un diagrama que ilustra el resultado de SDS-PAGE en función del pH del eluato en cromatografía multimodo.

La Figura 7 muestra el resultado de la elución en cromatografía de afinidad.

La Figura 8 muestra un proceso general para purificar heparán-N-sulfatasa según una modalidad de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA Y MODALIDADES PREFERIDAS DE LA INVENCION

A continuación, se describirá la presente invención con más detalle haciendo referencia a ejemplos. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración de la presente invención y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la misma.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que aprecian los expertos en el campo al que pertenece la presente invención.

Ejemplo

Ejemplo 1: Clarificación de la solución de cultivo celular

La solución de cultivo celular que contiene heparán-N-sulfatasa producida de forma recombinante y una o más impurezas se sometió a filtración profunda utilizando un filtro de profundidad.

Específicamente, se dejó que el agua destilada fluyera completamente hacia un filtro de profundidad Cat. No. MD0HC054H1 o No. de Cat. MX0HC027H1 de Merck KGaA y un filtro de profundidad Cat. No. NP6PDK516 o Cat. No. NP5LPDD16 de Pall Corporation para eliminar la solución contenida en el filtro, pH 7.5, se dejó que fluyera tampón Tris 50 mM para alcanzar un estado de equilibrio y luego la solución de cultivo celular se filtró en el rango de ≤ 2.0 bar.

La tasa de recuperación fue del 95% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 0.4 LRV (valor de reducción logarítmica).

Ejemplo 2: Ultrafiltración/diafiltración primaria (UF/DF)

La solución de cultivo celular clarificada se sometió a ultrafiltración/diafiltración primaria para realizar la concentración y el intercambio de tampón.

Específicamente, se dejó que un tampón Tris de 50 mM y pH 7.5 fluyera en una malla Pellicon 3 Ultracel C (No. de Cat. P3C030C01) con un valor de corte de 30 a 50 kDa de Merck KGaA o una membrana Omega T-series de 30 kDa (OS030T12) de Poll Corporation, para lograr un estado de equilibrio, y el filtrado del cultivo se concentró 10 veces en comparación con el volumen inicial, se concentró hasta 13 veces en comparación con el volumen inicial a través del intercambio de tampón con 3 DV (volumen de diafiltración) o más de un tampón Tris de 50 mM y pH 7.5 y luego se recuperó.

El factor de concentración fue de 7 a 13 veces y el volumen de intercambio de tampón fue de 3 DV o más. Finalmente, la tasa de recuperación fue del 95% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 0.1 LRV (valor de reducción logarítmica) o más.

Ejemplo 3: Cromatografía de intercambio aniónico primario

3.1 Validación de la cromatografía de intercambio aniónico básico (AEX)

La solución principalmente ultrafiltrada/diafiltrada se sometió a cromatografía de intercambio aniónico utilizando, como resina de intercambio aniónico fuerte, Q Sepharose 6 Fast Flow, Fractogel EMD TMAE (M) o Poros XQ, y utilizando, como resina de intercambio aniónico débil, DEAE Sepharose Fast Flow.

Específicamente, la resina se sometió a CIP (limpieza en el lugar, por sus siglas en inglés) con 5 CV (volumen de columna) de NaOH 0.5 N, se dejó fluir 15 CV de tampón de equilibrio Tris (tampón EQ) a pH 7.5 ± 0.5 , 50 mM para lograr un estado de equilibrio y se cargó la solución primaria de UF/DF. Luego, se inyectó tampón de equilibrio Tris a pH 7.5 ± 0.5 , 50 mM en 5 CV para lograr un estado de equilibrio nuevamente, se inyectaron 5 CV de tampón de elución Tris 50 mM (pH 7.5 ± 0.5 , NaCl 200 ± 50 mM) y se recolectó el eluato hasta 2.5 CV (132.5 mL) cuando la señal UV durante la cromatografía fue de 50 mAu.

Luego, se inyectaron 5 CV de pH 7.5 ± 0.5 , 2000 ± 200 mM de NaCl y 50 mM de tampón de lavado de columna Tris (tampón CW) y se sometieron a CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N y se dejó que fluyeran 15 CV de tampón de equilibrio para alcanzar un estado de equilibrio.

El resultado de la cromatografía de intercambio aniónico en las condiciones descritas

anteriormente mostró que, cuando se inyectaron CW y NaOH no unidos además de la elución en el cromatograma, se detectaron señales UV, lo que significa que se eliminaron impurezas (ver Figura 1), y el resultado de SDS-PAGE mostró que, en el eluato (Carril 3), se eliminaron al menos tantas impurezas como en el Carril 2 y el Carril 4 en comparación con la muestra de carga (Carril 1) (ver Figura 2).

En general, el rendimiento fue de aproximadamente el 90% o más, la pureza fue de aproximadamente el 70% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 0.2 LRV o más. Todas las resinas utilizadas tuvieron tasas de recuperación similares tras la optimización del proceso. Por lo tanto, se prefiere Q Sepharose teniendo en cuenta la solidez del proceso y la viabilidad económica.

3.2 Optimización de la cromatografía de intercambio aniónico (AEX)

Como se muestra en la Tabla 1, se probó el rendimiento del proceso AEX mientras se variaba el pH del proceso y la concentración de NaCl en el tampón de elución.

Específicamente, la prueba se realizó con una diferencia de ± 0.5 en función del pH experimental inicial (pH 7.5), y se realizó una elución escalonada con concentraciones de NaCl de 100, 150 y 200 mM para determinar el rendimiento de elución de la proteína objetivo, heparán-N-sulfatasa, dependiendo de la concentración de NaCl en el tampón de elución a cada pH.

Tabla 1

Rendimiento de AEX en función del pH del proceso y la concentración de NaCl en el tampón de elución

pH del proceso	Muestra (Concentración de NaCl)	Volumen	Contenido de proteína objetivo (ELISA)	
			Contenido (mg/ml)	Rendimiento (%)
7.0	Carga	60.0	1.851	N/A
	Sin límites	210.0	0.099	18.7
	Elución 1 (100 mM)	300.0	0.279	75.4
	Elución 2 (150 mM)	150.0	0.046	12.4
	Elución 3 (200 mM)	150.0	0.003	0.4
	CW	150.0	0.003	0.4
7.5	Carga	60.0	1.822	N/A
	Sin límites	210.0	0.084	16.2
	Elución 1 (100 mM)	300.0	0.269	73.9
	Elución 2 (150 mM)	300.0	0.065	17.9
	Elución 3 (200 mM)	150.0	0.006	0.9
	CW	150.0	0.003	0.4
8.0	Carga	60.0	1.896	N/A
	Sin límites	210.0	0.016	2.9
	Elución 1 (100 mM)	300.0	0.344	90.8
	Elución 2 (150 mM)	300.0	0.046	12.1
	Elución 3 (200 mM)	150.0	0.006	0.8
	CW	150.0	0.003	0.4
Criterios de aceptación			N/A	≥ 80

El resultado mostró que la heparán-N-sulfatasa se unió a la resina a un pH de 7.0 a 8.0 y que una gran proporción de heparán-N-sulfatasa se eluyó de NaCl 100 mM. Además, la mayor parte de la heparán-

N-sulfatasa se recuperó de la fracción de NaCl 150 mM. Por lo tanto, se encontró que se podían obtener resultados satisfactorios cuando la concentración de NaCl en el tampón de elución era de 100 mM, preferiblemente de NaCl 150 mM o más.

Ejemplo 4: Tratamiento con disolvente/detergente

Los virus se inactivaron en el eluido obtenido por la AEX primaria mediante tratamiento con disolvente/detergente (tratamiento S/D).

Específicamente, se añadió una solución madre de S/D al eluato obtenido por la AEX primaria para lograr 1% de Polisorbato 80 y 0.3% de TnBP, y se agitó a 20 a 25°C durante 1 hora.

En este momento, el tratamiento S/D se realizó en tres condiciones de pH 7.3, 7.5 y 7.7 durante un máximo de 6 horas, y se confirmó que era posible un tratamiento S/D suficiente dentro del rango de pH definido anteriormente. Sin embargo, cuando el tiempo de tratamiento supera las 6 horas, la turbidez del eluato puede provocar un riesgo de proceso. Por lo tanto, es preferible ajustar el tiempo de tratamiento a menos de 6 horas.

Ejemplo 5: Cromatografía de intercambio catiónico

5.1 Validación de la cromatografía de intercambio catiónico básica (CEX)

Se realizó una cromatografía de intercambio catiónico utilizando resina SP Sepharose Fast Flow para maximizar la recuperación de heparán-N-sulfatasa de la solución tratada con S/D y eliminar impurezas, especialmente disolventes y detergentes, que son impurezas del proceso.

Específicamente, la resina se sometió a CIP (limpieza en el lugar) con 5 CV (volumen de columna) de NaOH 0.5 N, se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio de acetato de sodio (SA) 20 mM (tampón EQ, pH 4.5 ± 0.1 , NaCl 100 ± 20 mM) para lograr un estado de equilibrio y se cargó la solución tratada con S/D.

Luego, se inyectaron 5 CV de tampón de equilibrio de acetato de sodio 20 mM (pH 4.5 ± 0.1 , 100 ± 20 mM NaCl) para lograr nuevamente un estado de equilibrio, se inyectaron 5 CV de tampón de elución de acetato de sodio 20 mM (pH 4.5 ± 0.1 , 200 ± 20 mM NaCl) y el eluato se recolectó inicialmente en una cantidad de 3 CV y luego se descartó como desecho en una cantidad restante de 2 CV.

Luego, se inyectaron 5 CV de tampón de lavado de columna de acetato de sodio 20 mM (tampón CW, pH 4.5 ± 0.1 , NaCl 2000 ± 200 mM), se realizó CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N y se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio para lograr un estado de equilibrio.

El resultado de la cromatografía de intercambio catiónico en las condiciones descritas anteriormente mostró que, cuando se inyectaron CW y NaOH no unidos además de la elución en el cromatograma, se detectaron señales UV, lo que significa que se eliminaron impurezas (véase la Figura 3), como se puede ver en el resultado de SDS-PAGE. En el eluato (carril 3), se eliminaron al menos tantas impurezas como en el carril 2 y el carril 4 en comparación con la muestra de carga (carril 1) (véase la Figura 4) y la pureza aumentó aproximadamente un 20% en comparación con el eluato de cromatografía de intercambio aniónico primario.

En general, el rendimiento fue de aproximadamente el 90% o más, la pureza fue de

aproximadamente el 93% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 1.2 LRV o más.

5.2 Optimización de la cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

Como se muestra en la Tabla 2, se probó el rendimiento del proceso CEX mientras se variaba el pH del proceso y la concentración de NaCl en el tampón de elución.

Específicamente, la prueba se realizó dentro del rango de 4.0 a 5.4, basado en el pH experimental inicial (pH 4.5), y se realizó una prueba dependiendo de la concentración de 2 a 300 mM, para determinar el rendimiento de elución de la proteína objetivo, heparán-N-sulfatasa, dependiendo de la concentración de NaCl en el tampón de elución a cada pH.

Tabla 2

Rendimiento de CEX en función del pH del proceso y la concentración de NaCl en el tampón de elución

Proceso		pH	Condición
Estudio pH 1	Equilibrio	4.5	20 mM S.A.+100 mM NaCl (pH 4.5)
	Carga		20 mM S.A. (pH 4.5) $\approx$ 10 mS/cm
	Re-equilibrio		20 mM S.A.+100 mM NaCl (pH 4.5)
	Elución		20 mM S.A.+200 mM NaCl (pH 4.5)
	Lavado de columnas		20 mM S.A.+ 2 M NaCl (pH 4.5)
	Equilibrio	5.0~5.4	20 mM S.A.+20 mM NaCl (pH 5.0~5.4)
	Carga		20 mM S.A. (pH 5.0~5.4) $\approx$ 4 mS/cm
	Re-equilibrio		20 mM S.A.+20 mM NaCl (pH 5.0~5.4)
	Elución		20 mM S.A.+50~300 mM NaCl (pH 5.0~5.4)
	Lavado de columnas		20 mM S.A.+ 2 M NaCl (pH 5.0~5.4)
Estudio pH 2	Equilibrio	4.4~4.6	20 mM S.A.+100 mM NaCl (pH 4.4~4.6)
	Carga		20 mM S.A. (pH 4.5) $\approx$ 10 mS/cm
	Re-equilibrio		20 mM S.A.+100 mM NaCl (pH 4.4~4.6)
	Elución		20 mM S.A.+200 mM NaCl (pH 4.4~4.6)
	Lavado de columnas		20 mM S.A.+ 2 M NaCl (pH 4.4~4.6)

Como se puede ver en la Tabla 3, el resultado mostró que la concentración óptima de NaCl en el tampón de elución en este momento fue de 50 (a pH 5.4) a 210 mM de NaCl (a pH 4.6 o menos).

Tabla 3

Resultados de la elución en función del pH del proceso y de la concentración de NaCl en el tampón de elución

Proceso	Ejecución No.	pH	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Estudio pH 1	3	4.5	86.7	89.7
	4	5.0	87.5	81.5
	4-1	5.0	64.6	91.3
	5	5.4	71.6	94.9
Estudio pH 2	1	4.4	88.5	99.8
	2	4.6	82.3	97.3
Criterios de aceptación			$\geq$ 78.0	$\geq$ 83.0

Ejemplo 6: Cromatografía multimodo

Se realizó una cromatografía multimodo utilizando resina Capto MMC capaz de realizar simultáneamente cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía de acción hidrofóbica (HIC) para

eliminar de manera más eficiente las impurezas del eluido CEX y purificar selectivamente la heparán-N-sulfatasa que contiene M6P (manosa 5-fosfato).

Específicamente, la resina se sometió a CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N, se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio de acetato de sodio (SA) 20 mM (tampón EQ, pH 4.5, NaCl 200 mM) para lograr un estado de equilibrio y se cargó el eluido CEX.

Luego, se inyectaron 5 CV de tampón de equilibrio de histidina 20 mM (pH 5.5 ± 0.1) para lograr un estado de reequilibrio y la columna se lavó principalmente con 5 CV de tampón de lavado primario de histidina 20 mM (pH 6.5 ± 0.1) y luego se lavó secundariamente con 10 CV de tampón de lavado secundario de histidina 20 mM (pH 6.85 ± 0.1).

Cuando el pH del tampón de lavado era de 6.5 a 6.9, la solución después del lavado contenía una gran cantidad de HCP, pero el contenido de heparán-N-sulfatasa era bastante bajo. El lavado se realizó en dos pasos, el pH del primer tampón de lavado era de 6.45 y el pH del tampón de lavado secundario se aumentó a 6.85, para eliminar de forma más eficiente el HCP y aumentar la tasa de recuperación de heparán-N-sulfatasa.

Luego, se inyectaron 10 CV de tampón de elución de histidina (pH 6.8 ± 0.1 a 8.3 ± 0.1 , 20 mM) y se recuperaron todos los eluatos.

El resultado mostró que la proteína objetivo, heparán-N-sulfatasa, se recuperó primero a un pH de tampón de elución de 6.7 y la recuperación apropiada de heparán-N-sulfatasa fue posible hasta un pH de tampón de elución de 8.4 (ver Figura 5).

Además, a medida que aumentaba el pH del tampón de elución, el rango de pI de la heparán-N-sulfatasa aumentaba gradualmente y no había una diferencia significativa en el contenido de FGly entre las fracciones, pero el contenido de M6P disminuía a medida que aumentaba el pH de elución. Es decir, la heparán-N-sulfatasa que tiene un valor de pI más bajo contiene una mayor cantidad de M6P (ver Figura 6 y Tabla 4).

Tabla 4

Eficacia de purificación de M6P en función del pH del tampón de elución

Muestra de pH	FGly (%)	M6P (mol/mol)	Profesional de la salud (ppm)	Pureza (%)
6.9	54.24	3.43	1365	97.8
7.1	54.72	3.10	485	98.5
7.3	54.64	2.97	304	98.4
7.5	53.82	2.61	223	97.9
7.7	54.45	2.56	199	97.8
CW	57.85	1.93	729	97.4

Luego, se inyectaron 5 CV de tampón de lavado de columna de histidina 20 mM (tampón CW, pH 7.5, NaCl 2000 mM), se realizó CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N y se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio para lograr un estado de equilibrio.

En general, el rendimiento fue de alrededor del 70-90% o más, la pureza fue de alrededor del 97% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de alrededor de 1.8 LRV o más.

Ejemplo 7: Cromatografía de afinidad

7.1 Validación de la cromatografía de afinidad básica

Se realizó cromatografía de afinidad utilizando resinas de heparina Sepharosa o Sepharosa azul para eliminar impurezas, por ejemplo, catepsina X, que se encuentran en su mayor parte en el eluido de MMC.

Específicamente, la resina se sometió a CIP con 5 CV de NaOH 0.1 N, se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio de acetato de sodio (SA) 20 mM (tampón EQ, pH 4.5, NaCl 200 mM) para lograr un estado de equilibrio y se cargó el eluyente MMC.

Posteriormente, se inyectaron 5 CV de tampón de equilibrio de acetato de sodio (SA) 20 mM (pH 4.5 ± 0.1) para lograr un estado de re-equilibrio y la columna se lavó secundariamente con 10 CV de tampón de lavado de acetato de sodio 20 mM (pH 4.5 ± 0.1 , 150 ± 20 mM NaCl).

Luego, se inyectaron 10 CV de tampón de elución de acetato de sodio 20 mM (pH 4.5 ± 0.1 , 300 ± 20 mM NaCl), se recuperó todo el eluato, se inyectaron 5 CV de tampón de lavado de acetato de sodio 20 mM (tampón CW, pH 4.5 ± 0.1 , 2000 ± 200 mM NaCl), se realizó CIP con 5 CV de NaOH 0.1 N y se dejó fluir 10 CV de tampón de equilibrio para alcanzar un estado de equilibrio.

El resultado de la cromatografía de afinidad según el proceso anterior mostró que la heparán-N-sulfatasa se purificó hasta una pureza muy alta, como se muestra en la Figura 7.

En general, el rendimiento fue de aproximadamente el 90% o más, la pureza fue de aproximadamente el 99% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 1.0 LRV o más.

7.2 Optimización de la cromatografía de afinidad

Como se muestra en la Tabla 5, se probó el rendimiento de la cromatografía de afinidad mientras se variaba el pH del proceso y la concentración de NaCl en el tampón de elución.

Específicamente, con base en la prueba de condición inicial, el pH se estableció en pH 4.5 ± 0.1 , la concentración central de NaCl del tampón de lavado se estableció en 150 mM y la concentración central de NaCl del tampón de elución se estableció en 300 mM.

Tabla 5

Resultados de la elución en función del pH del proceso y de la concentración de NaCl en el tampón de elución

Ejecución No.	Muestra	Contenido de HNS		Contenido de HCP		Pureza (%)
		mg/ml	Rendimiento (%)	ng/mg	LRV	
Ejecución 1	Carga	0.5	-	947.4	-	98.31
	Lavado (130 mM)	0.01	1.8	-	-	-
	Elución (300 mM)	0.54	86.9	154.8	0.8	100
Ejecución 2	Carga	0.50	-	947.4	-	-
	Lavado (150 mM)	0.01	1.84	-	-	-
	Elución (300 mM)	0.55	88.2	158.0	0.8	100
Ejecución 3	Carga	0.50	-	947.4	-	-
	Lavado (170 mM)	0.01	1.94	-	-	-
	Elución (300 mM)	0.55	89.0	115.2	0.9	100
Ejecución 4	Carga	0.50	-	947.40	-	-
	Lavado (150 mM)	0.01	1.94	-	-	-

	Elución (280 mM)	0.49	79.2	77.80	1.1	99.99
Ejecución 5	Carga	0.50	-	947.4	-	-
	Lavado (150 mM)	0.01	2.05	-	-	-
	Elución (320 mM)	0.58	93.1	66.5	1.2	99.97
Criterios de aceptación		N / A	N/A	≥ 70	N/A	≥ 0.5

Como se puede observar en la Tabla 5, el resultado mostró que el HCP se eliminó de manera eficiente y se obtuvo heparán-N-sulfatasa con alta pureza cuando la concentración de NaCl del tampón de lavado estaba en el rango de 130 a 170 mM y la concentración de NaCl en el tampón de elución estaba en el rango de 280 a 320 mM.

Ejemplo 8: Precipitación de caprilato

Se realizó una precipitación de caprilato para precipitar y eliminar el HCP que tiene un pI más bajo.

Específicamente, se preparó una solución madre de 500 mM de caprilato de sodio y se añadió al eluato de cromatografía de afinidad para ajustar la concentración a 10 mM.

Luego, se dejó que la precipitación ocurriera en condiciones de pH de 4.5 ± 0.1 y 20 a 25°C durante 1 a 3 horas mientras se agitaba a una velocidad de 200 ± 20 rpm, y las impurezas precipitadas se eliminaron por filtración.

Como se puede observar en la Tabla 6, el resultado mostró que el contenido de HCP, que es la mayoría de las impurezas, se redujo en gran medida cuando se realizó la precipitación de caprilato en comparación con el caso en el que no se realizó la precipitación de caprilato. Casi no se detectó catepsina X, la principal HCP, y la carboxipeptidasa Pro-X lisosomal se redujo en gran medida.

Tabla 6

Efecto de eliminación de impurezas por precipitación de caprilato

Impureza (HCP)	Valor medido (ppm)	
	Sin precipitación	Con precipitación
Catepsina X	3,100	N.D
Carboxipeptidasa lisosomal Pro-X	2,758	705
Alfa-manosidasa	839	286
Alfa-L-fucosidasa	749	N.D
Desoxirribonucleasa II (fragmento)	683	284
Proteína transmembrana	443	N.D
Beta-glucuronidasa	419	N.D
Proteína de unión al ARN 34	413	N.D
Beta-galactosidasa (fragmento)	338	N.D
Carboxipeptidasa	292	N.D
Atractina	289	251
Di-N-acetilquitobiasa	267	N.D
AGA	265	N.D
Alfa-galactosidasa	264	N.D

N.D.: No determinado

En general, el rendimiento fue de aproximadamente el 90% o más, la pureza fue de

aproximadamente el 99% o más y la capacidad de eliminación de HCP fue de aproximadamente 1.0 LRV o más.

Ejemplo 9: Ultrafiltración/diafiltración secundaria (UF/DF)

El sobrenadante del precipitado de caprilato se ajustó a un pH y una conductividad adecuados para la cromatografía de intercambio aniónico secundario mediante ultrafiltración/diafiltración secundaria. Después de la segunda ultrafiltración/diafiltración, el factor de concentración aumentó aproximadamente 2 veces, el volumen de intercambio del tampón fue de 3 DV o más, el pH aumentó de 4.5 a aproximadamente 7.5 y la conductividad disminuyó de 25 mS/cm a 6 mS/cm o menos.

Específicamente, se dejó fluir un tampón de histidina 20 mM a pH 7.5 usando una membrana Pellicon 3 Ultracel C screen (Cat No. P3C030C01) de Merck que tiene un valor de corte de 30 a 50 kDa, para lograr un estado de equilibrio, el sobrenadante del precipitado de caprilato se concentró al doble en comparación con el volumen inicial, el tampón se intercambió con 2 DV o más de tampón de histidina 20 mM a pH 7.5, la solución de proceso se recuperó cuando la conductividad alcanzó 6 mS/cm o menos y luego el pH de la solución de proceso recuperada se ajustó a 7.5.

Ejemplo 10: Cromatografía de intercambio aniónico secundario

Para eliminar las impurezas relacionadas con el proceso, como heparina, caprilato, disolvente y detergente de la segunda solución de ultrafiltración/diafiltración, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico secundario utilizando, como resinas de intercambio aniónico fuertes, Fractogel EMD TMAE (M) y Fractogel EMD TMAE (S).

Específicamente, la resina se sometió a CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N, se dejó fluir 15 CV de tampón de equilibrio de histidina 20 mM (pH 7.5 $\pm$ 0.5, NaCl 50 mM) para alcanzar un estado de equilibrio y se cargó la solución secundaria de UF/DF. Luego, se inyectaron 10 CV de tampón de equilibrio de histidina 20 mM (pH 7.0 $\pm$ 0.5, NaCl 50 mM) para alcanzar un estado de equilibrio y se inyectaron 7 CV de tampón de elución de histidina 20 mM (pH 7.0 $\pm$ 0.5, NaCl 150 $\pm$ 10 mM).

Luego, se inyectaron 5 CV de tampón de lavado de columna de histidina 20 mM (tampón CW, pH 7.0 $\pm$ 0.5, NaCl 2000 $\pm$ 200 mM), se realizó CIP con 5 CV de NaOH 0.5 N y se dejó fluir un tampón de equilibrio a 10 CV para lograr un estado de equilibrio.

En general, el rendimiento fue de aproximadamente el 90% o más, la pureza fue de aproximadamente el 99% o más y casi no hubo diferencia entre las resinas.

Además, el resultado de la prueba realizada mientras se fijaba la concentración de NaCl en el eluato a 150 mM y se cambiaba el pH de 6.8 a 7.7 mostró que la heparán-N-sulfatasa podía purificarse eficientemente en todos los casos, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Efecto de purificación del AEX en función del pH

No. de Exp.	pH de solución de carga	Contenido de proteínas (UV)		
		Muestra de Carga	Grupo de elución	Rendimiento

		Vol. (mL)	Conc. (mg/mL)	Vol. (mL)	Conc. (mg/mL)	(%)
1	7.5	117.8	1.10	78.5	1.53	92.73
2	7.3	117.8	1.15	78.5	1.56	90.43
3	7.7	117.8	1.12	78.5	1.55	92.26
4	7.0	25	1.73	39.3	1.05	95.29
5	6.8	22	1.98	39.3	1.04	93.71
6	7.2	26	1.61	39.3	1.03	96.58

Además, el resultado de la prueba realizada mientras se fijaba el pH en 7.5 y se cambiaba la concentración de NaCl en el eluato a 130 a 150 mM mostró que la heparán-N-sulfatasa podía purificarse eficientemente en todos los casos, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Efecto de purificación de AEX en función de la concentración de NaCl en el eluato

Concentración de NaCl (mM)	Contenido de proteínas (UV)					Pureza
	Muestra de carga		Grupo de elución		Rendimiento (%)	Grupo de elución
	Vol. (mL)	Conc. (mg/mL)	Vol. (mL)	Conc. (mg/mL)		Pureza (%)
1	142.7	0.55	80	1.03	106.0	99.19
2	142.7	0.55	80	0.93	95.7	99.06
3	142.7	0.55	160	0.51	104.9	99.96

Ejemplo 11: Nanofiltración

Finalmente, para eliminar los virus mediante filtración, se realizó una nanofiltración con nanofiltros de Merck KGaA, Asahi y Sartorius. Aunque no hubo diferencias entre los productos de los fabricantes, la tasa de recuperación del nanofiltro de Sartorius fue bastante alta y el rendimiento general fue superior al 90%.

Ejemplo 12: Ultrafiltración/diafiltración terciaria (UF/DF)

Se realizó ultrafiltración/diafiltración terciaria para la formulación final para lograr una alta concentración e intercambio de tampón.

Específicamente, se dejó fluir un tampón de histidina 4.2 mM (pH 8.2, NaCl 93.75 mM) utilizando una membrana de filtro Pellicon 3 Ultracel C (No. de Cat. P3C030C01) de Merck KGaA con un valor de corte de 30 a 50 kDa, para lograr un estado de equilibrio, y el eluido AEX secundario se concentró a aproximadamente 5 mg/mL y luego se recuperó.

En la Figura 8 se muestra un diagrama de proceso general según una modalidad específica de la presente invención.

Aunque se han descrito en detalle configuraciones específicas de la presente invención, los expertos en la materia apreciarán que la presente invención puede implementarse en formas modificadas sin apartarse de las características esenciales de la presente invención. Por lo tanto, las modalidades descritas anteriormente deben considerarse desde un punto de vista ilustrativo en lugar de limitativo. El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones en lugar de en la descripción anterior y todas las diferencias

equivalentes a las mismas se interpretarán como que están dentro del alcance de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

El método para purificar heparán-N-sulfatasa según la presente invención puede mejorar en gran medida la pureza, seguridad y estabilidad de la heparán-N-sulfatasa producida eliminando eficientemente HCP y otras impurezas, siendo así muy adecuado para la producción eficiente de heparán-N-sulfatasa para su uso en terapia de reemplazo enzimático.