



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202403043 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：112109733 (22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 16 日
(51)Int. Cl. : C12N9/16 (2006.01) A61K38/46 (2006.01)
A61P3/00 (2006.01)
(30)優先權：2022/03/18 美國 63/321,636
(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)
美國
(72)發明人：瓦西連科 湯瑪士 WASYLENKO, THOMAS M. (US)；布勞爾 凱文 BROWER,
KEVIN (US)；金 曉英 JIN, XIAOYING (US)
(74)代理人：陳彥希；何愛文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：87 項 圖式數：21 共 141 頁

(54)名稱
重組人類酸性鞘磷脂酶醫藥組合物及方法

(57)摘要
本文公開了包含重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的組合物，其具有所需的純度、比活性和/或 rASM 同功型。還提供了用於製造和純化此類組合物的方法，所述方法包括層析步驟。進一步提供了調節組合物中的 rASM 比活性的方法，以及調節組合物中的 rASM 同功型的方法。本文公開的方法可特別用於製造用以治療酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD)的包含 rASM 的醫藥組合物。

Disclosed here are compositions comprising recombinant acid sphingomyelinase (rASM) having desired purity, specific activity, and/or rASM isoforms. Also provided are methods for making and purifying such compositions, comprising chromatography steps. Further provided are methods of modulating rASM specific activity in a composition, and methods of modulating rASM isoforms in a composition. The methods disclosed here can be particularly useful for manufacturing pharmaceutical compositions comprising rASM for treating acid sphingomyelinase deficiency (ASMD).

指定代表圖：



圖1

【發明摘要】

【中文發明名稱】 重組人類酸性鞘磷脂酶醫藥組合物及方法

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL RECOMBINANT HUMAN ACID

SPHINGOMYELINASE COMPOSITIONS AND METHODS

【中文】

本文公開了包含重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的組合物，其具有所需的純度、比活性和/或rASM同功型。還提供了用於製造和純化此類組合物的方法，所述方法包括層析步驟。進一步提供了調節組合物中的rASM比活性的方法，以及調節組合物中的rASM同功型的方法。本文公開的方法可特別用於製造用以治療酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD)的包含rASM的醫藥組合物。

【英文】

Disclosed here are compositions comprising recombinant acid sphingomyelinase (rASM) having desired purity, specific activity, and/or rASM isoforms. Also provided are methods for making and purifying such compositions, comprising chromatography steps. Further provided are methods of modulating rASM specific activity in a composition, and methods of modulating rASM isoforms in a composition. The methods disclosed here can be particularly useful for manufacturing pharmaceutical compositions comprising rASM for treating acid sphingomyelinase deficiency (ASMD).

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 重組人類酸性鞘磷脂酶醫藥組合物及方法

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL RECOMBINANT HUMAN ACID

SPHINGOMYELINASE COMPOSITIONS AND METHODS

【技術領域】

【0001】 本發明涉及組合物和用於製造重組酸性鞘磷脂酶如重組人酸性鞘磷脂酶的方法。

【先前技術】

【0002】 酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD)是一種罕見的威脅生命的溶酶體貯積障礙。它是一種常染色體隱性遺傳疾病，是由編碼溶酶體酶酸性鞘磷脂酶(ASM)的SMPD1基因中的突變引起的(Schuchman等人, *Mol Genet Metab.* (2017) 120(1-2):27-33)。ASMD患者無法代謝鞘磷脂，結果其在多個器官的溶酶體中積累，在嚴重的情況下導致內臟疾病和神經退化。ASMD患者的脾、肝、肺和骨髓中的膽固醇和其他脂質增加。

【0003】 奧利普酶 α (Olipudase alfa)是一種重組人酸性鞘磷脂酶，能夠顯著改善成人和兒童患者中ASMD的關鍵臨床表現。然而，仍然需要以商業規模生產包含奧利普酶 α 的具有所需的純度和一致的比活性的醫藥組合物。

【發明內容】

【0004】 本揭露提供了一種純化重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的方法。在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使包含rASM和宿主細胞蛋白(HCP)的蛋白質混合物經受陽離子交換(CEX)層析；或者使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)；或者使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受CEX層析和IMAC兩者。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【0005】 在一些實施例中，使所述蛋白質混合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC。

【0006】 在一些實施例中，所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。

【0007】 在一些實施例中，所述蛋白質混合物係從表現所述rASM的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞獲得的。

【0008】 在一些實施例中，所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【0009】 在一些實施例中，所述陽離子交換層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【0010】 在一些實施例中，所述IMAC是螯合樹脂。

【0011】 在一些實施例中，所述IMAC是用鋅、銅、或鎳進行的。

【0012】 在一些實施例中，所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌所述CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0013】 在一些實施例中，所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後所述CEX層析柱上所結合的rASM。

【0014】 在一些實施例中，所述CEX洗滌緩衝液選自表2a，並且所述CEX溶析緩衝液選自表2b。

【0015】 在一些實施例中，所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌所述IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0016】 在一些實施例中，所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在洗滌步驟後所述IMAC柱上所結合的rASM。

【0017】 在一些實施例中，所述IMAC洗滌緩衝液選自表3，並且所述IMAC溶析緩衝液選自表4。

【0018】 在一些實施例中，所述純化的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。在一些實施例中，所述純化的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。在一些實施例中，所述純化的rASM製劑的比活性為約10-20 U/mg。所述純化的rASM製劑的比活性係依據實例4測量。

【0019】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的純度為至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

【0020】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過1.0 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過3.0 µg/mg、不超過4.0 µg/mg或不超過5.0 µg/mg。

【0021】 在一些實施例中，所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【0022】 在一些實施例中，所述具有修飾的rASM同功型包含選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾。

【0023】 在一些實施例中，在生產規模為至少100 L的生物反應器中生產所述蛋白質混合物。

【0024】 在一些實施例中，在生產規模為至少500 L的生物反應器中生產所述蛋白質混合物。

【0025】 在一些實施例中，所述方法部分或完全地在 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的冷藏條件下進行。在一些實施例中，所述方法部分或完全地在環境溫度下進行。

【0026】 本文還提供了一種調節初始rASM組合物中重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的同功型的相對量的方法，其中所述初始rASM組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型。在一些實施例中，所述方法包括使所述初始rASM組合物經受陽離子交換(CEX)層析；或者使所述初始

rASM組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)；或者使所述初始rASM組合物經受CEX層析和IMAC兩者。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【0027】 在一些實施例中，使所述初始rASM組合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC。

【0028】 在一些實施例中，使所述初始rASM組合物串聯地經受IMAC和CEX層析，並且使從所述IMAC獲得的溶析液經受所述CEX。

【0029】 在一些實施例中，使所述初始rASM組合物分別地經受所述CEX層析和所述IMAC兩者，其中在兩者之間具有一個或多個另外的步驟。

【0030】 在一些實施例中，所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。在一些實施例中，所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【0031】 在一些實施例中，所述陽離子交換層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【0032】 在一些實施例中，所述IMAC是螯合樹脂柱。

【0033】 在一些實施例中，所述IMAC是用鋅、銅或鎳進行的。

【0034】 在一些實施例中，所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌所述CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0035】 在一些實施例中，所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適

pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在洗滌步驟後所述CEX層析柱上所結合的所有種類。

【0036】 在一些實施例中，所述CEX洗滌緩衝液選自表2a，並且所述CEX溶析緩衝液選自表2b。

【0037】 在一些實施例中，所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌所述IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0038】 在一些實施例中，所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在洗滌步驟後所述IMAC柱上所結合的所有種類。

【0039】 在一些實施例中，所述IMAC洗滌緩衝液選自表3，並且所述IMAC溶析緩衝液選自表4。

【0040】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg。根據實例4測量所述純化的rASM製劑的比活性。

【0041】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過1.0 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過3.0 µg/mg、不超過4.0 µg/mg或不超過5.0 µg/mg。

【0042】 在一些實施例中，所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【0043】 在一些實施例中，所述修飾選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組。

【0044】 在一些實施例中，在生產規模為至少100 L或至少500 L的生物反應器中生產包含rASM的起始組合物。

【0045】 在一些實施例中，所述方法部分或完全地在 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的冷藏條件下進行。在一些實施例中，所述方法部分或完全地在環境溫度下進行。

【0046】 進一步提供了一種調節液體組合物中的重組酸性鞘磷脂酶(rASM)比活性的方法，所述液體組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型。在一些實施例中，所述方法包括使所述液體組合物經受陽離子交換(CEX)層析；或者使所述液體組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)；或者使所述液體組合物經受CEX層析和IMAC兩者。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【0047】 在一些實施例中，使所述液體組合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC，或者其中使所述液體組合物串聯地經受IMAC和CEX層析，並且使從所述IMAC獲得的溶析液經受所述CEX層析。

【0048】 在一些實施例中，使所述初始rASM組合物分別地經受所述CEX層析和所述IMAC兩者，其中在兩者之間具有一個或多個另外的步驟。

【0049】 在一些實施例中，所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。在一些實施例中，所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【0050】 在一些實施例中，所述陽離子交換層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【0051】 在一些實施例中，所述IMAC是螯合樹脂柱。

【0052】 在一些實施例中，所述IMAC是用鋅、銅或鎳進行的。

【0053】 在一些實施例中，所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌所述CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0054】 在一些實施例中，所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在洗滌步驟後所述CEX層析柱上所結合的所有種類。

【0055】 在一些實施例中，所述CEX洗滌緩衝液選自表2a，並且所述CEX溶析緩衝液選自表2b。

【0056】 在一些實施例中，所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌所述IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【0057】 在一些實施例中，所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在洗滌步驟後所述IMAC柱上所結合的所有種類。

【0058】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg。根據實例4測量所述純化的rASM製劑的比活性。

【0059】 在一些實施例中，所述製劑中的rASM的純度為至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

【0060】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過1.0 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過3.0 µg/mg、不超過4.0 µg/mg或不超過5.0 µg/mg。

【0061】 在一些實施例中，所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【0062】 在一些實施例中，所述修飾選自C末端半胱胺醯化、S-羧基甘肽化、二聚化和截短組成之群組。

【0063】 在一些實施例中，在生產規模為至少100 L或至少500 L的生物反應器中生產所述包含rASM的液體組合物。

【0064】 在一些實施例中，所述方法部分或完全地在 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的冷藏條件下進行。在一些實施例中，所述方法部分或完全地在環境溫度下進行。

【0065】 本揭露還提供了一種重組酸性鞘磷脂酶(rASM)製劑，所述rASM製劑包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型。在一些實施例中，所述未經修飾的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些實施例中，所述未經修飾的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多。

【0066】 在一些實施例中，所有經修飾的rASM同功型總共佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過10%、不超過15%、不超過20%、不超過25%、不超過30%、不超過35%或不超過40%。

【0067】 在一些實施例中，所有經修飾的rASM同功型總共佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【0068】 在一些實施例中，具有C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過10%。在一些實施例中，所述具有C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【0069】 在一些實施例中，具有C末端S-麩胱甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過5%。在一些實施例中，所述具有C末端S-麩胱甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%或更少。

【0070】 在一些實施例中，具有C末端二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過0.2%。

【0071】 在一些實施例中，所述具有C末端S-二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過0.1%。

【0072】 在一些實施例中，具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過8%。

【0073】 在一些實施例中，所述具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%或更少。

【0074】 在一些實施例中，所述rASM製劑的純度為至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高。

【0075】 在一些實施例中，所述rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。在一些實施例中，所述rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg。根據實例4測量所述純化的rASM製劑的比活性。

【0076】 在一些實施例中，所述製劑中的rASM的純度為至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

【0077】 在一些實施例中，所獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過1.0 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過3.0 µg/mg、不超過4.0 µg/mg或不超過5.0 µg/mg。

【0078】 在一些實施例中，使用如本文所述的方法製造所述rASM製劑。

【0079】 還提供了一種使用如本文所述的重組酸性鞘磷脂酶(rASM)製劑製備的醫藥組合物。

【0080】 進一步提供了一種治療有需要的個體的酸性鞘磷脂酶缺乏症的方法，所述方法包括向所述個體投予如本文所述的醫藥組合物。在一些實施例中，所述方法進一步包括使所述純化的rASM進行緩衝液交換的步驟。

【圖式簡單說明】

【0081】 圖1描繪了具有或不具有修飾的rhASM的不同同功型。

【0082】 圖2(SEQ ID NO: 13 - 20)描繪了具有或不具有修飾的rhASM的C末端附近的結構。藉由MMTS標記後對rhASM天然Asp-N消化物的LC-MS來監測rhASM的C末端狀態。僅示出了rhASM的C末端胺基酸。

【0083】 圖3描繪了富集的rhASM單體和富集的rhASM二聚體的比活性。每個富集群體的純度百分比顯示在相應條的上方。

【0084】 圖4描繪了包含各種相對豐度的總C末端修飾的rASM組合物的比活性。

【0085】 圖5描繪了在CEX層析步驟中不同鹽(NaCl)和pH條件下的HCP清除率(上圖)或回收率(下圖)。

【0086】 圖6描繪了IMAC步驟中不同鹽(NaCl)和pH條件下的HCP清除率

(左圖)和回收率(右圖)的等高線圖。

【0087】圖7描繪了CEX層析步驟中不同鹽(NaCl)和pH條件下的HCP清除率(上圖)或比活性(下圖)。

【0088】圖8描繪了IMAC步驟中不同鹽(NaCl)和pH條件下的HCP清除率(左圖)和比活性(右圖)的等高線圖。

【0089】圖9描繪了在CEX操作的載入材料、洗滌級分和溶析級分中的rhASM的代表性比活性。像指定的那樣測試了多個洗滌條件(氯化鈉45 mM，在pH 6.3、pH 6.5和pH 6.7下)。

【0090】圖10A描繪了在IMAC方法的載入材料、洗滌級分和溶析級分中的rhASM的比活性。

【0091】圖10B描繪了在IMAC方法的載入材料、洗滌級分和溶析級分中的rhASM的純度。測試了多個洗滌條件(溫和：10 mM磷酸鈉，在pH 6.6下；中等：10 mM磷酸鈉、20 mM氯化鈉，在pH 6.0下；強烈：10 mM磷酸鈉、80 mM氯化鈉，在pH 5.8下)。

【0092】圖11描繪了在CEX操作的載入材料、洗滌級分和溶析級分中的rhASM同功型的代表性歸一化豐度。變體1：未經修飾的rhASM同功型；變體2：具有C末端半胱胺酸半胱胺醯化的經修飾的rhASM同功型；變體3：具有C末端S-麩胱甘肽化的經修飾的rhASM同功型；變體4：二聚化形式1；變體5：C末端截短形式1。關於這些同功型的詳細資訊，參見表1。

【0093】圖12描繪了在IMAC操作的載入材料、洗滌級分和溶析級分中的rhASM同功型的代表性歸一化豐度。變體1：未經修飾的rhASM同功型；變體2：具有C末端半胱胺酸半胱胺醯化的經修飾的rhASM同功型；變體3：具有C末端S-

麩胱甘肽化的經修飾的rhASM同功型；變體4：二聚化形式1；變體5：C末端截短形式1。關於這些同功型的詳細資訊，參見表1。

【0094】圖13描繪了使用純化的rhASM(奧利普酶 α)治療ASMD患者的臨床研究。

【0095】圖14描繪了用奧利普酶 α 或安慰劑治療的患者中預測DL_{CO}%的變化百分比。DLCO = 一氧化碳彌散量；FVC = 用力肺活量。

【0096】圖15描繪了在奧利普酶 α 治療之前(左圖)和之後(右圖)肺的高解析度電腦斷層(HRCT)掃描。鞘磷脂填充的巨噬細胞作為毛玻璃陰影而被觀察到。

【0097】圖16描繪了雙肺中的HRCT毛玻璃外觀得分(左圖)和間質性肺疾病得分(右圖)，其在奧利普酶 α 治療的患者中顯示出平均改善，而在安慰劑治療的患者中並非如此。

【0098】圖17描繪了在奧利普酶 α 治療的患者中脾體積的變化%(左圖)和脾腫大相關得分的變化(右圖)，其在安慰劑治療的患者中並非如此。

【0099】圖18描繪了肝體積的變化%。ALT：丙胺酸轉胺酶；AST：天門冬胺酸轉胺酶；HDL-C：高密度脂蛋白膽固醇；LDL-C：低密度脂蛋白膽固醇；MN：正常值的倍數。

【0100】圖19描繪了從用安慰劑或奧利普酶 α 治療的患者獲得的組織中鞘磷脂佔據的組織面積百分比。

【0101】圖20描繪了用安慰劑或奧利普酶 α 治療的患者中肝活檢物的代表性甲苯胺藍染色圖像(鞘磷脂表現為深色染色)。

【0102】圖21描繪了用安慰劑治療的患者和用奧利普酶 α 治療的患者中歸一化血漿殼三糖苷酶(左圖)，以及兩個群體中的預輸注血漿溶血鞘磷脂水平。

【實施方式】

【0103】 在描述本發明之前，應當理解，本發明並不限於所述的特定方法和實驗條件；因為此類方法和條件可變。還應當理解，因為本發明的範圍將僅由所附申請專利範圍限制，所以本文所用的術語僅是出於描述具體實施例的目的，而不旨在是限制性的。

【0104】 除非另有定義，否則本文所用的所有技術術語和科學術語具有與通常所理解的相同的含義。

【0105】 如本文所用，在涉及可測量值(如量、持續時間等)時，“約”意在涵蓋相對於指定值+ 20%或 $\pm 10\%$ (包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$)的變化，因為此類變化適合於執行所公開的方法。

【0106】 “多肽”、“肽”和“蛋白質”在本文中可互換地用於指代胺基酸殘基的聚合物。多肽可以是天然(組織衍生的)來源的、由原核或真核細胞製劑重組或天然表現的、或者經由合成方法化學產生的。所述術語適用於其中一個或多個胺基酸殘基是相應的天然存在的胺基酸的人工化學類比物的胺基酸聚合物，以及適用於天然存在的胺基酸聚合物和非天然存在的胺基酸聚合物。胺基酸模擬物是指具有與胺基酸的一般化學結構不同的結構，但是以與天然存在的胺基酸類似的方式發揮功能的化學化合物。非天然殘餘物詳細描述於科學文獻和專利文獻中。

【0107】 如本文所用的“肽”包括作為本文具體例示的那些肽的保守變體的肽。如本文所用的“保守變體”表示將胺基酸殘基用另一個生物學上相似的殘基替代。保守變體的例子包括但不限於將一個疏水殘基(如異白胺酸、纈胺酸、白胺

酸、丙胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、色胺酸、酪胺酸、正白胺酸或甲硫胺酸)取代為另一個，或者將一個極性殘基取代為另一個，如用精胺酸取代離胺酸、用麩胺酸取代天門冬胺酸、或用麩醯胺酸取代天門冬醯胺酸等。可以相互取代的中性親水性胺基酸包括天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸和蘇胺酸。“保守變體”還包括使用經取代的胺基酸替代未經取代的親本胺基酸，條件是與未經取代的多肽免疫反應的抗體也對經取代的多肽產生免疫反應。此類保守取代在本發明的肽的類別的定義內。

【0108】 當關於蛋白質使用時，“重組”表示所述蛋白質是通過將異源核酸引入宿主細胞而產生的。

【0109】 如本文所用，“載入”是載入到層析材料上的組合物。載入緩衝液是用於將包含目的產物的組合物載入到層析材料上的緩衝液。在載入待純化的組合物之前，可以將層析材料用平衡緩衝液平衡。在一些例子中，在將所述組合物載入到層析材料上之後並且在目的多肽從固定相溶析之前使用洗滌緩衝液。然而，可以通過洗滌緩衝液從層析材料中移取一些目的產物(例如多肽)(即在流過物中)。

【0110】 如本文所用，“溶析”是從層析材料中移取產物，例如多肽。溶析緩衝液是用於從層析材料中溶析多肽或其他目的產物的緩衝液。在許多情況下，溶析緩衝液具有與載入緩衝液不同的物理特徵。例如，溶析緩衝液可以具有與載入緩衝液不同的電導率或與載入緩衝液不同的pH。在一些實施例中，溶析緩衝液具有低於載入緩衝液的電導率。在一些實施例中，溶析緩衝液具有高於載入緩衝液的電導率。在一些實施例中，溶析緩衝液具有低於載入緩衝液的pH。在一些實施例中，溶析緩衝液具有高於載入緩衝液的pH。在一些實施例中，溶

析緩衝液具有與載入緩衝液不同的電導率和不同的pH。溶析緩衝液可以具有較高或較低的電導率以及較高或較低的pH的任意組合。

【0111】 “電導率”是指水性溶液在兩個電極之間傳導電流的能力。在溶液中，電流通過離子傳輸流動。因此，隨著水性溶液中存在的離子量的漸增，溶液將具有較高的電導率。電導率的基本度量單位是西門子(或姆歐)、姆歐(mS/cm)，並且可以使用電導率儀(如各種型號的Orion電導率儀)進行測量。由於電解電導率是溶液中離子攜帶電流的能力，因此可以通過改變溶液中離子的濃度來改變溶液的電導率。例如，可以改變溶液中緩衝劑的濃度和/或鹽(例如，氯化鈉、乙酸钠或氯化鉀)的濃度，以達到所需電導率。優選地，更改各種緩衝液的鹽濃度以達到所需電導率。

【0112】 “宿主細胞蛋白”(HCP)是來自在其中產生多肽的細胞的蛋白質。例如，CHOP是來自宿主細胞的蛋白質，即中國倉鼠卵巢蛋白。可以通過酶聯免疫吸附測定(“ELISA”)或質譜法來測量CHOP的量。在本文所述的任何方法的一些實施例中，HCP(例如，CHOP)的量減少了大於約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個。HCP的量可以減少約在10%與99%、30%與95%、30%與99%、50%與95%、50%與99%、75%與99%、或85%與99%之間中的任一個。在一些實施例中，HCP的量減少了約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或98%中的任一個。在一些實施例中，通過將從一個或多個純化步驟回收的組合物中的HCP的量與一個或多個純化步驟之前的組合物中的HCP的量進行比較來確定所述減少。

【0113】 本揭露提供了包含重組ASM(如重組人ASM(rhASM))的組合物。在一些實施例中，所述rhASM是奧利普酶 α 。本揭露的組合物具有優異的一致性

和純度。在一些實施例中，本發明的組合物是醫藥組合物，即呈這樣的形式或可以製備以變成這樣的形式組合物，以允許活性成分的生物活性有效，同時不含有在患者體內具有明顯的毒性或以其他方式引起與活性成分無關的有害的副作用的另外的成分。術語“醫藥組合物”和“醫藥製劑”在本文中可互換使用。本發明的醫藥組合物可用於治療患有ASM缺乏症的患者。

【0114】 原料藥一致性是在製造原料藥/活性醫藥成分中的最終步驟的重要考慮因素。它確保在批次之間保持一致的功效，從而確保品質。有必要進行研究，以確保批次的全部內容是同質的，並且批次之間是一致的。

【0115】 在純化過程期間，導致優異的宿主細胞蛋白清除率的條件可能會影響產物的比活性。諸位發明人進行了研究以鑒定關鍵步驟以確保在純化過程中很好地控制最終產物中的比活性。作為結果，諸位發明人發現了通過調節未經修飾的rhASM和經修飾的rhASM同功型的相對量來控制rhASM產物中rhASM同功型(例如具有C末端半胱氨酸修飾(包括半胱氨酸醯化、S-羧基甘氨酸化、二聚化和C末端截短)的rhASM同功型)的比例，從而控制最終產物的比活性的方式。所述發現導致穩健且有效地控制產品品質和過程性能。

重組人酸性鞘磷脂酶

【0116】 ASM是一種催化鞘磷脂分解為神經醯胺和磷酸膽鹼的酶。“重組人ASM”是指通過重組的方式製備的相對於野生型序列有或沒有某些氨基酸修飾的人類ASM。例如，重組人ASM可以在培養的哺乳動物宿主細胞(例如，COS、CHO、HeLa、3T3、293T、NSO、SP2/0或HuT 78細胞等)中或在人ASM編碼序列為轉基因的動物中表現。

【0117】 在一些實施例中，所述重組人ASM是奧利普酶 α 。奧利普酶 α 是在

CHO細胞中產生的人ASM(EC-3.1.4.12)的糖型 α 。成熟的奧利普酶 α 是一種570個胺基酸的多肽，其保留了天然人蛋白質的酶促和溶酶體靶向活性。奧利普酶 α 的胺基酸序列(包括其前導序列(殘基1-57))在下文顯示為SEQ ID NO: 1，其中前導序列是斜體並且加粗。成熟的奧利普酶 α 序列(SEQ ID NO: 2，其跨越SEQ ID NO: 1的殘基58-627)沒有前導序列。

MARYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLALALALALALSDSRVLWAPAE
AHPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSV
AIKLCNLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSS
WNISLPTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGS
GLPPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQ
TRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEA
MAKAWEPWLPAEALRTLRIIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAG
QLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGH
THVDEFEVFYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNPgyrvyQIDGNYSGSSHVLDH
ETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTF
WFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLMPDGSLPEAQLWPRPL
FC (SEQ ID NO: 1)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAI
KLCNLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSW
NISLPTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGL
PPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTR
QDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMA
KAWEPWLPAEALRTLRIIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQL
QWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGH
THVDEFEVFYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNPgyrvyQIDGNYSGSSHVLDHET
YILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWF
LYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLMPDGSLPEAQLWPRPLFC
(SEQ ID NO: 2)

【0118】 在其他實施例中，可用於本發明的人ASM與奧利普酶 α 在胺基酸序列方面是99%、98%、97%、96%或95%相同的。例如，組合物中的人ASM可以具有美國專利6,541,218中所示的序列，將其公開內容通過引用以其整體併入本文。該序列(SEQ ID NO: 3)在下文示出，前導序列(殘基1-59)是斜體並且加粗，其中成熟蛋白質(SEQ ID NO: 4，其跨越SEQ ID NO: 3的殘基60-629)沒有前導序

列。

MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALSDSRVLWAPAEAH
PLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCsRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHThVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPgyRVYQIDGNYSRSSHVLDHETyILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMpDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 3)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCsRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHThVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPgyRVYQIDGNYSRSSHVLDHETyILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMpDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 4)

【0119】 所述組合物中的人ASM與在UNIPROT資料庫中公開為序列
P17405-1的人ASM或其多態性變體在胺基酸序列方面也可以相同。P17405-1序
列在下文示出(SEQ ID NO: 5)，前導序列(殘基1-59)是斜體並且加粗，其中成熟
蛋白質(SEQ ID NO: 6，其跨越SEQ ID NO: 5的殘基60-629)沒有前導序列。

MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALSDSRVLWAPAEAH
PLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCsRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHThVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPgyRVYQIDGNYSRSSHVLDHETyILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMpDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 5)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPVAVGNHSTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFLLINSTDPAGQLQWL VGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNP GYRVYQIDGNYS GSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 6)

【0120】 rhASM DNA、診斷方法和rhASM蛋白由美國專利5,773,278、美國專利5,686,240和美國專利6,541,218覆蓋，將其中的每一個通過引用以其整體併入本文。

【0121】 宿主細胞中產生的重組人ASM(rhASM)可以作為一種或多種同功型的混合物存在。在一些實施例中，所述同功型在圖1和圖2中示出，也如以下表1所總結的。C末端狀態和C末端修飾的種類的相對比例可以通過LC-MS分析確定。

表1. rhASM同功型

同功型	僅C末端序列*
未經修飾的形式 (C末端處具有游離巰基的單體)	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7)
二聚化形式1	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7) ...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7)
二聚化形式2	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7) ...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7)
S-羧胱甘肽化	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC:GSH (SEQ ID NO: 8)
半胱胺醯化	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLFC:Cys (SEQ ID NO: 9)
C末端截短形式1	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPLF (SEQ ID NO: 10) (C缺失的)
C末端截短形	...DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPL (SEQ ID NO: 11)

式2	(FC缺失的)
C末端截短形式3	...DSPALCRHLMPDGS LPEAQSLWPRP (SEQ ID NO: 12) (LFC缺失的)
*(僅顯示從SEQ ID NO: 1的位置600，SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 6的位置543，或者SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 5的位置602開始的rhASM胺基酸)	

細胞培養的方法

【0122】 用於在宿主細胞(如中國倉鼠卵巢細胞)中表現重組ASM的組合物和方法描述於美國專利5,773,278中，將其通過引用以其整體併入本文。為了表現具有生物活性的ASM，可以將酶的編碼序列、功能等效物或經修飾的序列插入適當的表現載體中，即，含有在適當的宿主細胞中轉錄和轉譯插入的編碼序列所必需的元件的載體。可以使用具有用於適當處理(即信號裂解、醯基化、磷酸化和蛋白質分選)的細胞機制和元件的宿主細胞表現系統。例如，哺乳動物宿主細胞表現系統可用於適當折疊和加工的生物活性酶的表現。當在人中投予時，此類表現產物應展現出適當的組織靶向性，並且不應展現出不良的免疫反應。

【0123】 熟習此項技術者熟知的方法可用於構建含有ASM編碼序列和適當的轉錄/轉譯控制信號的表現載體。這些方法包括體外重組/遺傳重組。參見例如，在Maniatis等人, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold spring Harbor Laboratory, N.Y., 第12章 (1982)中描述的技術。

【0124】 在細菌系統中，可以根據所表現的ASM蛋白的用途有利地選擇多種表現載體。例如，當要產生大量的ASM時，可能需要引導高水平的易於純化的融合蛋白產物表現的載體。此類載體包括但不限於大腸桿菌(*E. coli*)表現載體pUR278(Ruther等人, *EMBO J.* (1983) 2:1791)，在所述大腸桿菌表現載體中可以將ASM編碼序列框內連接到具有lac Z編碼區的載體中，使得產生雜交AS-lac Z蛋白；pIN載體(Inouye和Inouye, *Nucleic acids Res.* (1985) 13:3101-9；Van Heeke

和Schuster, *J Biol Chem.* (1989) 264:5503-9)；等等。

【0125】 可以使用各種真核宿主-載體系統來表現ASM編碼序列。儘管原核系統具有易於操作和放大成本低的獨特優勢，但是它們在ASM表現中的主要缺點是缺乏所表現的哺乳動物蛋白的適當轉譯後修飾。真核系統、以及優選哺乳動物表現系統允許發生適當的修飾。應當將具有適當處理初級轉錄物(例如基因產物的糖基化、磷酸化和有利分泌)的細胞機制的真核細胞用作表現ASM的宿主細胞。哺乳動物細胞株是優選的。此類宿主細胞株可以包括但不限於CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、-293、WI38等。

【0126】 對於重組蛋白的長期高產率產生，可以使用穩定表現。例如，在引入外來DNA之後，可以使工程化細胞在富集培養基中生長1至2天，然後轉移到選擇性培養基。不同於使用含有病毒複製起點的表現載體，可以將宿主細胞用由適當的表現控制元件(例如啟動子、增強子、序列、轉錄終止子、聚腺苷酸化位點等)和選擇性標記物控制的ATN或DNA轉化。重組質體中的選擇性標記物賦予對選擇的抗性，並且允許細胞將質體穩定地整合到它們的染色體中並生長以形成集落，進而可以選殖並擴增成細胞株。可以使用包括但不限於單純疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人, *Cell* (1977) 11:223)、次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(Szybalska和Szybalski, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1962) 48:2026)、和腺嘌呤磷酸核糖基轉移酶(Lowy等人, *Cell* (1980) 22:817)基因的多種選擇系統，其可以分別用於tk-、hprt-或aprt-細胞。同樣，抗代謝物抗性可以用作選擇以下基因的基礎：dhfr，其賦予對胺甲喋呤的抗性(Wigler等人, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1980) 77:3567；O'Hare等人, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1981) 78:1527)；gpt，其賦予對黴酚酸的抗性(Mulligan和Berg, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1981) 78:2072)；neo，其賦

予對胺基糖苷G-418的抗性(Colberre-Garapin等人, *J Mol Biol.* (1981) 150:1)；和hygro，其賦予對潮黴素的抗性(Santerre等人, *Gene* (1984) 30:147)。最近，已經描述了另外的選擇基因，即trpB，其允許細胞利用吡啶替代色胺酸；hisD，其允許細胞利用組胺醇(histinol)替代組胺酸(Hartman和Mulligan, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1988) 85:8047)；和ODC(鳥胺酸脫羧酶)，其賦予對鳥胺酸脫羧酶抑制劑(2-(二氟甲基)-DL-鳥胺酸，DFMO)的抗性(McConlogue L., 在: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory編輯 (1987))。

【0127】 可用於表現ASM酶的替代性真核表現系統是用含有ASM編碼序列的重組酵母表現載體轉化的酵母；用含有ASM編碼序列的重組病毒表現載體(例如杆狀病毒)感染的昆蟲細胞系統；或者用含有ASM編碼序列的重組病毒表現載體(例如花椰菜花葉病毒，CaMV；菸草花葉病毒，TMV)感染或用含有ASM編碼序列的重組質體表現載體(例如Ti質體)轉化的植物細胞系統。

【0128】 在酵母中，可以使用多種含有組成型或誘導型啟動子的載體。關於綜述，參見Current Protocols in Molecular Biology, 第2卷, 1988, 編輯Ausubel等人, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 第13章；Grant等人, 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, Methods in Enzymology, 編輯Wu和Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., 第153卷, 第516-544頁；Glover, 1986, DNA Cloning, 第II卷, IRL Press, Wash., D.C., 第3章；以及Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, 編輯Berger和Kimmel, Acad. Press, N.Y., 第152卷, 第673-684頁；以及The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, 編輯Strathern等人, Cold Spring Harbor Press, 第I卷和第II卷。為了在酵母中進行互補測定，可以將ASM的cDNA選殖到酵母附加體質體(YEp)

中，由於酵母2 μ 環的存在，所述酵母附加體質體在酵母中自主複製。可以將cDNA選殖在組成型酵母啟動子(如ADH或LEU2)或誘導型啟動子(如GAL)後面(Cloning in Yeast, 第3章, R. Rothstein 在: DNA Cloning 第11卷, A Practical Approach, 編輯D. M. Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.)。構建體可能含有同源ASM mRNA的5'和3'非轉譯區或者對應於酵母基因的那些區域。YE ϕ 質體以高效率轉化，並且質體非常穩定。可替代地，可以使用其促進外來DNA序列整合到酵母染色體中的載體。

【0129】 在使用植物表現載體的情況下，ASM編碼序列的表現可以由多種啟動子中的任一種驅動。例如，可以使用病毒啟動子，如CaMV的35S RNA和19S RNA啟動子(Brisson等人, *Nature* (1984) 310:511-514)、或TMV的外殼蛋白啟動子(Takamatsu等人, *EMBO J.* (1987) 6:307-311)；可替代地，可以使用植物啟動子，如RUBISCO的小亞基(Coruzzi等人, *EMBO J.* (1984) 3:1671-1680；Broglie等人, *Science* (1984) 224:838-843)；或熱休克啟動子例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B(Gurley等人, *Mol Cell Biol.* (1986) 6:559-565)。可以使用Ti質體、Ri質體、植物病毒載體；直接DNA轉化；顯微注射、電穿孔等將這些構建體引入植物細胞。關於此類技術的綜述，參見例如，Weissbach和Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, 第VIII節, 第421-463頁；以及Grierson和Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 第2版, Blackie, London, 第7-9章。

【0130】 可用於表現ASM的替代性表現系統是昆蟲系統。在一個這種系統中，將苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)核型多角體病毒(AcNPV)用作表現外來基因的載體。使病毒在草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞中生長。可以將ASM序列選殖到病毒的非必需區(例如多角體蛋白基因)中，並且置於AcNPV啟

動子(例如多角體蛋白啟動子)的控制下。編碼序列的成功插入將導致多角體蛋白基因的失活和非閉合重組病毒(即，缺乏由多角體蛋白基因編碼的蛋白質外殼的病毒)的產生。然後使用這些重組病毒感染表現插入基因的草地貪夜蛾細胞(參見例如，Smith等人, *J Virol.* (1983) 46:584；Smith, 美國專利號4,215,051)。

純化rASM以及調節其比活性和同功型的方法

【0131】 本揭露提供了出乎意料的發現，即通過改變純化方法，人們可以調節包含rASM的組合物中rASM(例如rhASM)的比活性和rASM同功型的比率。可以使用此一創新將一批rASM的比活性調整至目標範圍內。相對於其他潛在的方法(例如，改變細胞培養方法)，這種調節比活性的方法可以更直接地實施，而對過程性能沒有顯著影響。

【0132】 因此，本揭露提供了如下方法：

I. 從蛋白質混合物純化rASM的方法。在一些實施例中，所述蛋白質混合物包含rASM和至少另一種蛋白質。在一些實施例中，所述蛋白質混合物包含rASM和宿主細胞蛋白，如CHO細胞蛋白。在一些實施例中，所述方法包括使包含rASM和宿主細胞蛋白(HCP)的蛋白質混合物經受陽離子交換(CEX)層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法包括使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC層析的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。在另外的實施例中，所述方法包括使包含rASM和HCP的蛋白質混合物分別地或串聯地經受CEX層析和IMAC兩者。可改變CEX和IMAC的順序。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使包含rASM和宿主細胞蛋白(HCP)的蛋白質

混合物經受CEX層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 使從所述CEX層析獲得的溶析液直接或間接地經受IMAC，如本文所述。如本文所用，術語“直接”意指在不通過另一步驟處理的情況下使從所述CEX層析獲得的溶析液直接經受IMAC，而術語“間接”意指在使從所述CEX層析獲得的溶析液經受IMAC之前，將所述溶析液通過一個或多個另外的步驟處理。例如，使從所述CEX層析獲得的溶析液經受IMAC之前，使所述溶析液通過另一個純化步驟(例如，另一個純化柱)。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。任選地，CEX層析和IMAC的順序可以交換。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受IMAC，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 使從所述IMAC獲得的溶析液直接或間接地經受CEX層析，如本文所述。如本文所用，術語“直接地”意指在不通過另一步驟處理的情況下使從所述IMAC獲得的溶析液直接經受CEX層析，而術語“間接地”意指在使從所述IMAC獲得的溶析液經受CEX層析之前，將所述溶析液通過一個或多個另外的步驟處理。例如，使從所述IMAC獲得的溶析液經受CEX層析之前，使所述溶析液通過另一個純化步驟(例如另一個純化柱)。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。在一些實施例中，為了從樣品中去除雜質(例如HCP)，可以在使樣品經受CEX層析和/或IMAC之前和/或之後包括一個或多個另外的純化步驟。此類純化步驟在美國專利號8,796,419、9,481,706、10,259,842以及PCT公開號WO 2008/085988 A1和WO 2019/121846 A1中進行了討論，將其中的每一個通過引用以其整體併入。

II. 調節初始rASM組合物中重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的同功型的相對量的

方法。組合物中rASM同功型的相對量等於所述同功型的歸一化豐度與所有rASM同功型組合時的總rASM豐度相比的百分比。例如，如果組合物中未經修飾的rASM的歸一化豐度為900萬，而組合物中所有rASM同功型的總rASM豐度為1000萬，則所述組合物中未經修飾的rASM的相對量為90%。所述初始rASM組合物可以包含未經修飾的rASM同功型和一或多種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化和截短的一個或多個修飾的rASM同功型。在一些實施例中，所述方法包括使所述初始rASM組合物經受CEX層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析的溶析液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法包括使所述初始rASM組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC層析的溶析液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。在另外的實施例中，所述方法包括使所述初始rASM組合物分別地或串聯地經受CEX層析和IMAC兩者。可改變CEX和IMAC的順序。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使包含rASM的初始組合物經受陽離子交換(CEX)層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述陽離子交換(CEX)層析的溶析液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法進一步包括使從所述CEX層析獲得的溶析液直接或間接地經受IMAC。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC的溶析液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。任選地，CEX層析和IMAC的順序可以交換。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使包含rASM的初始組合物經受IMAC，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述IMAC的溶析

液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法進一步包括使從所述IMAC獲得的溶析液直接或間接地經受CEX層析。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集從所述CEX層析獲得的溶析液，從而獲得具有調節的相對量的rASM同功型的rASM製劑。在一些實施例中，此類方法增加了所述組合物中未經修飾的rASM同功型的相對量，同時減少了至少一種選自C末端半胱胺醯化、S-羧基甘氨酸化、二聚化和截短的經修飾的rASM同功型的相對量，如本文所述。在一些實施例中，當與初始rASM組合物中的相比時，所獲得的組合物中的未經修飾的rASM同功型的相對量增加至少0.1%、至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少0.6%、至少0.7%、至少0.8%、至少0.9%、至少1.0%、至少1.1%、至少1.2%、至少1.3%、至少1.4%、至少1.5%、至少1.6%、至少1.7%、至少1.8%、至少1.9%、至少2.0%、至少2.1%、至少2.2%、至少2.3%、至少2.4%、至少2.5%、至少2.6%、至少2.7%、至少2.8%、至少2.9%、至少3.0%、至少3.1%、至少3.2%、至少3.3%、至少3.4%、至少3.5%、至少3.6%、至少3.7%、至少3.8%、至少3.9%、至少4.0%、至少4.1%、至少4.2%、至少4.3%、至少4.4%、至少4.5%、至少4.6%、至少4.7%、至少4.8%、至少4.9%、至少5.0%或更多。在一些實施例中，所述經修飾的rASM同功型的相對量減少至少5%、至少10%、15%、至少20%、25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或更多。在一些實施例中，所獲得的組合物中的未經修飾的rASM同功型的相對量為至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、

至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多。

III. 調節包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化和截短的一個或多個修飾的rASM同功型的液體組合物中的重組酸性鞘磷脂酶(rASM)比活性的方法。在一些實施例中，所述方法包括使所述液體組合物經受陽離子交換(CEX)層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述陽離子交換(CEX)層析的溶析液，從而獲得具有調節的比活性的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法包括使所述液體組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC層析的溶析液，從而獲得具有調節的比活性的rASM製劑。在另外的實施例中，所述方法包括使所述初始rASM組合物分別地或串聯地經受CEX層析和IMAC兩者。可改變CEX和IMAC的順序。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使所述液體組合物經受陽離子交換(CEX)層析，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述陽離子交換(CEX)層析的溶析液，從而獲得具有調節的比活性的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法進一步包括使從所述CEX層析獲得的溶析液直接或間接地經受IMAC。在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述IMAC的溶析液，從而獲得具有進一步調節的比活性的rASM製劑。任選地，CEX層析和IMAC的順序可以交換。例如，在一些實施例中，所述方法包括 (i) 使所述液體組合物經受IMAC，如本文所述。在一些實施例中，所述方法進一步包括 (ii) 收集來自所述IMAC的溶析液，從而獲得具有調節的比活性的rASM製劑。在一些實施例中，所述方法進一步包括使從所述IMAC獲得的溶析液直接或間接地經受CEX層析。

在一些實施例中，所述方法進一步包括收集來自所述CEX層析的溶析液，從而獲得具有進一步調節的比活性的rASM製劑。在某些實施例中，所獲得的rASM製劑具有降低的比活性。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑中的比活性降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑中的比活性為約5-50 U/mg，如約10-40 U/mg、約15-45 U/mg、約10-30 U/mg、約15-35 U/mg或約10-20 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑中的比活性為約5 U/mg、約10 U/mg、約15 U/mg、約20 U/mg、約25 U/mg、約30 U/mg、約35 U/mg、約40 U/mg、約45 U/mg、約50 U/mg。

【0133】 在一些實施例中，本揭露的rASM可以在宿主細胞中產生。例如，收集表現rASM的宿主細胞和/或包含rASM的細胞培養物以產生收穫物。在本文所述的方法中，可以根據需要按原樣使用或濃縮所收穫的細胞和/或細胞培養物。在一些實施例中，將所述收穫物濃縮。在一些實施例中，在純化之前，通過合適的方法(例如，過濾)使所述收穫物澄清，以產生澄清的收穫物。在一些實施例中，將所述收穫物裂解以產生裂解物。

【0134】 在一些實施例中，在所述過程中使用陽離子交換(CEX)層析以減少宿主細胞蛋白和/或提供病毒清除率。如本文所用，術語“CEX”、“陽離子交換培養基”、“陽離子交換樹脂”和“陽離子交換材料”是指帶負電荷的固相，並且其因此具有游離陽離子用於與經過或穿過所述固相的水溶液中的陽離子交換。附接至固相以形成陽離子交換樹脂的帶負電荷的配體可以是例如羧酸鹽或磺酸鹽。可商購的陽離子交換樹脂包括但不限於羧甲基纖維素、固定在瓊脂糖上的磺丙

基(SP)(例如來自Pharmacia的SP-SEPHAROSE FAST FLOW™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™)和固定在瓊脂糖上的磺醯基(例如來自Pharmacia的S-SEPHAROSE FAST FLOW™)。在一些實施例中，所述陽離子交換層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)的樹脂。在一些實施例中，所述CEX層析包括 (1) 將包含rASM的液體組合物載入到CEX層析膜或柱；(2) 用洗滌緩衝液洗滌所述CEX層析膜或柱；(3) 用溶析緩衝液從所述CEX層析膜或柱溶析rASM；以及 (4) 收集包含rASM的溶析液。術語“平衡緩衝液”是指用於在將樣品載入到層析之前平衡層析樹脂的緩衝液。術語“洗滌緩衝液”是指用於在將樣品載入到層析上之後洗滌層析樹脂的緩衝液。在一些實施例中，所述洗滌緩衝液和所述平衡緩衝液是相同的或不同的。在一些情況下，所述洗滌緩衝液和所述載入緩衝液可以相同。“洗滌”層析介質意在將樣品載入到層析介質之後，使適當的緩衝液通過介質或經過介質。“溶析緩衝液”用於將靶蛋白從固相中溶析出。溶析緩衝液的電導率和/或pH通常使得靶蛋白從層析樹脂中溶析出。從層析樹脂中“溶析”分子(例如，目的多肽或雜質)意在通過改變溶液條件使得緩衝液與目的分子競爭結合層析樹脂，或者使得目的分子與樹脂之間的結合相互作用減弱，導致目的分子解離而從所述樹脂中移取所述分子。一個非限制性的例子是通過改變離子交換材料周圍的緩衝液的離子強度，使得緩衝液與分子競爭所述離子交換材料上的帶電位點，從而從離子交換樹脂中溶析所述分子。如本文所用，術語“溶析液”是指經由溶析獲得的含有目的分子的溶液以及由於流過物純化獲得的含有目的靶蛋白的流過物級分。在一些實施例中，術語“溶析液”是指來自結合和溶析層析步驟收集的溶析池。

【0135】 在一些實施例中，所述CEX層析包括 (1) 將包含rASM的組合物載

入到CEX層析膜或CEX層析柱。在一些實施例中，所述組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種經修飾的rASM同功型，如本文所述。

【0136】 在一些實施例中，所述CEX層析進一步包括 (2) 用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的洗滌緩衝液洗滌所述膜或所述柱。所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述組合物的起始比活性預先確定的。在一些實施例中，所述洗滌緩衝液包含基於磷酸鹽(如磷酸鈉)的pH緩衝系統。在一些實施例中，所述磷酸鈉濃度為約5至100 mM，如約5 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM或約100 mM。

【0137】 在一些實施例中，所述洗滌緩衝液包含最適鹽濃度的鹽。在一些實施例中，所述鹽是氯化鈉。在一些實施例中，所述氯化鈉濃度為約5至100 mM，如約5 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM或約100 mM。

【0138】 在一些實施例中，所述第一最適鹽濃度和所述第一最適pH選自下表2a中的條件。

表2a. CEX洗滌緩衝液的鹽(NaCl)/pH條件

	pH 6.1	pH 6.2	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0
0 mM	CEX W1	CEX W26	CEX W51	CEX W76	CEX W101	CEX W126	CEX W151	CEX W176	CEX W201	CEX W226
2 mM	CEX W2	CEX W27	CEX W52	CEX W77	CEX W102	CEX W127	CEX W152	CEX W177	CEX W202	CEX W227
4 mM	CEX W3	CEX W28	CEX W53	CEX W78	CEX W103	CEX W128	CEX W153	CEX W178	CEX W203	CEX W228
6 mM	CEX W4	CEX W29	CEX W54	CEX W79	CEX W104	CEX W129	CEX W154	CEX W179	CEX W204	CEX W229
8	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX	CEX

	pH 6.1	pH 6.2	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0
mM	W5	W30	W55	W80	W105	W130	W155	W180	W205	W230
10 mM	CEX W6	CEX W31	CEX W56	CEX W81	CEX W106	CEX W131	CEX W156	CEX W181	CEX W206	CEX W231
12 mM	CEX W7	CEX W32	CEX W57	CEX W82	CEX W107	CEX W132	CEX W157	CEX W182	CEX W207	CEX W232
14 mM	CEX W8	CEX W33	CEX W58	CEX W83	CEX W108	CEX W133	CEX W158	CEX W183	CEX W208	CEX W233
16 mM	CEX W9	CEX W34	CEX W59	CEX W84	CEX W109	CEX W134	CEX W159	CEX W184	CEX W209	CEX W234
18 mM	CEX W10	CEX W35	CEX W60	CEX W85	CEX W110	CEX W135	CEX W160	CEX W185	CEX W210	CEX W235
20 mM	CEX W11	CEX W36	CEX W61	CEX W86	CEX W111	CEX W136	CEX W161	CEX W186	CEX W211	CEX W236
22 mM	CEX W12	CEX W37	CEX W62	CEX W87	CEX W112	CEX W137	CEX W162	CEX W187	CEX W212	CEX W237
25 mM	CEX W13	CEX W38	CEX W63	CEX W88	CEX W113	CEX W138	CEX W163	CEX W188	CEX W213	CEX W238
30 mM	CEX W14	CEX W39	CEX W64	CEX W89	CEX W114	CEX W139	CEX W164	CEX W189	CEX W214	CEX W239
35 mM	CEX W15	CEX W40	CEX W65	CEX W90	CEX W115	CEX W140	CEX W165	CEX W190	CEX W215	CEX W240
40 mM	CEX W16	CEX W41	CEX W66	CEX W91	CEX W116	CEX W141	CEX W166	CEX W191	CEX W216	CEX W241
45 mM	CEX W17	CEX W42	CEX W67	CEX W92	CEX W117	CEX W142	CEX W167	CEX W192	CEX W217	CEX W242
50 mM	CEX W18	CEX W43	CEX W68	CEX W93	CEX W118	CEX W143	CEX W168	CEX W193	CEX W218	CEX W243
55 mM	CEX W19	CEX W44	CEX W69	CEX W94	CEX W119	CEX W144	CEX W169	CEX W194	CEX W219	CEX W244
60 mM	CEX W20	CEX W45	CEX W70	CEX W95	CEX W120	CEX W145	CEX W170	CEX W195	CEX W220	CEX W245
65 mM	CEX W21	CEX W46	CEX W71	CEX W96	CEX W121	CEX W146	CEX W171	CEX W196	CEX W221	CEX W246
70 mM	CEX W22	CEX W47	CEX W72	CEX W97	CEX W122	CEX W147	CEX W172	CEX W197	CEX W222	CEX W247
75 mM	CEX W23	CEX W48	CEX W73	CEX W98	CEX W123	CEX W148	CEX W173	CEX W198	CEX W223	CEX W248
80 mM	CEX W24	CEX W49	CEX W74	CEX W99	CEX W124	CEX W149	CEX W174	CEX W199	CEX W224	CEX W249
85 mM	CEX W25	CEX W50	CEX W75	CEX W100	CEX W125	CEX W150	CEX W175	CEX W200	CEX W225	CEX W250

【0139】 一般而言，洗滌緩衝液中較高的pH和/或較高的鹽濃度導致較高的純度(例如較高的HCP清除率)，但導致較低的比活性和較低的回收率。因此，根據目標純度和比活性，CEX洗滌條件可以選自CEX W1至CEX W250。在一些

實施例中，所述條件選自CEX W1至CEX W25；在一些實施例中，所述條件選自CEX W26至CEX W50；在一些實施例中，所述條件選自CEX W51至CEX W75；在一些實施例中，所述條件選自CEX W76至CEX W100；在一些實施例中，所述條件選自CEX W101至CEX W125；在一些實施例中，所述條件選自CEX W126至CEX W150；在一些實施例中，所述條件選自CEX W151至CEX W175；在一些實施例中，所述條件選自CEX W176至CEX W200；在一些實施例中，所述條件選自CEX W201至CEX W225；在一些實施例中，所述條件選自CEX W226至CEX W250。在一些實施例中，所述條件選自CEX W36、CEX W61、CEX W86、CEX W111、CEX W37、CEX W62、CEX W87、CEX W112、CEX W38、CEX W63、CEX W88、CEX W113、CEX W39、CEX W64、CEX W89、CEX W114、CEX W40、CEX W65、CEX W90和CEX W115。在一些實施例中，所述條件選自CEX W66、CEX W91、CEX W116、CEX W67、CEX W92、CEX W117、CEX W68、CEX W93、CEX W118、CEX W69、CEX W94、CEX W119、CEX W70、CEX W95和CEX W120。在一些實施例中，所述條件選自CEX W141、CEX W166、CEX W191、CEX W142、CEX W167、CEX W192、CEX W143、CEX W168、CEX W193、CEX W144、CEX W169、CEX W194、CEX W145、CEX W170和CEX W195。在一些實施例中，所述條件選自CEX W136、CEX W161、CEX W186、CEX W137、CEX W162、CEX W187、CEX W138、CEX W163、CEX W188、CEX W139、CEX W164、CEX W189、CEX W140、CEX W165和CEX W190。

【0140】 在一些實施例中，所述CEX層析進一步包括 (3) 用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的溶析緩衝液溶析所述膜或所述柱。在一些實施例中，所述第二最適pH與所述洗滌緩衝液中使用的的第一最適pH相同或相近。在一些實施

例中，所述第二最適鹽濃度是根據所述洗滌緩衝液中的第一最適鹽濃度預先確定的。通常，使用高於第一最適鹽濃度的鹽濃度來溶析與膜或柱結合的rASM。在一些實施例中，所述溶析緩衝液中的鹽濃度為約150 mM、約160 mM、約170 mM、約180 mM、約190 mM、約200 mM、約210 mM、約220 mM、約230 mM、約240 mM或約250 mM。在一些實施例中，所述溶析緩衝液包含基於磷酸鹽(如磷酸鈉)的pH緩衝系統。在一些實施例中，所述磷酸鈉濃度為約5至100 mM，如約5 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM或約100 mM。在一些實施例中，所述磷酸鈉濃度與CEX洗滌緩衝液中的磷酸鈉濃度相同或相似。

【0141】 在一些實施例中，所述溶析緩衝液包含最適鹽濃度的鹽。在一些實施例中，所述鹽是氯化鈉。

【0142】 在一些實施例中，所述溶析緩衝液的第二最適鹽濃度和第二最適pH選自下表2b中的條件。

表2b. CEX溶析緩衝液的鹽(NaCl)/pH條件

	pH 6.1	pH 6.2	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0
110 mM	CEX E1	CEX E26	CEX E51	CEX E76	CEX E101	CEX E126	CEX E151	CEX E176	CEX E201	CEX E226
115 mM	CEX E2	CEX E27	CEX E52	CEX E77	CEX E102	CEX E127	CEX E152	CEX E177	CEX E202	CEX E227
120 mM	CEX E3	CEX E28	CEX E53	CEX E78	CEX E103	CEX E128	CEX E153	CEX E178	CEX E203	CEX E228
125 mM	CEX E4	CEX E29	CEX E54	CEX E79	CEX E104	CEX E129	CEX E154	CEX E179	CEX E204	CEX E229
130 mM	CEX E5	CEX E30	CEX E55	CEX E80	CEX E105	CEX E130	CEX E155	CEX E180	CEX E205	CEX E230
135 mM	CEX E6	CEX E31	CEX E56	CEX E81	CEX E106	CEX E131	CEX E156	CEX E181	CEX E206	CEX E231
140 mM	CEX E7	CEX E32	CEX E57	CEX E82	CEX E107	CEX E132	CEX E157	CEX E182	CEX E207	CEX E232

	pH 6.1	pH 6.2	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0
145 mM	CEX E8	CEX E33	CEX E58	CEX E83	CEX E108	CEX E133	CEX E158	CEX E183	CEX E208	CEX E233
150 mM	CEX E9	CEX E34	CEX E59	CEX E84	CEX E109	CEX E134	CEX E159	CEX E184	CEX E209	CEX E234
155 mM	CEX E10	CEX E35	CEX E60	CEX E85	CEX E110	CEX E135	CEX E160	CEX E185	CEX E210	CEX E235
160 mM	CEX E11	CEX E36	CEX E61	CEX E86	CEX E111	CEX E136	CEX E161	CEX E186	CEX E211	CEX E236
165 mM	CEX E12	CEX E37	CEX E62	CEX E87	CEX E112	CEX E137	CEX E162	CEX E187	CEX E212	CEX E237
170 mM	CEX E13	CEX E38	CEX E63	CEX E88	CEX E113	CEX E138	CEX E163	CEX E188	CEX E213	CEX E238
175 mM	CEX E14	CEX E39	CEX E64	CEX E89	CEX E114	CEX E139	CEX E164	CEX E189	CEX E214	CEX E239
180 mM	CEX E15	CEX E40	CEX E65	CEX E90	CEX E115	CEX E140	CEX E165	CEX E190	CEX E215	CEX E240
185 mM	CEX E16	CEX E41	CEX E66	CEX E91	CEX E116	CEX E141	CEX E166	CEX E191	CEX E216	CEX E241
190 mM	CEX E17	CEX E42	CEX E67	CEX E92	CEX E117	CEX E142	CEX E167	CEX E192	CEX E217	CEX E242
195 mM	CEX E18	CEX E43	CEX E68	CEX E93	CEX E118	CEX E143	CEX E168	CEX E193	CEX E218	CEX E243
200 mM	CEX E19	CEX E44	CEX E69	CEX E94	CEX E119	CEX E144	CEX E169	CEX E194	CEX E219	CEX E244
205 mM	CEX E20	CEX E45	CEX E70	CEX E95	CEX E120	CEX E145	CEX E170	CEX E195	CEX E220	CEX E245
210 mM	CEX E21	CEX E46	CEX E71	CEX E96	CEX E121	CEX E146	CEX E171	CEX E196	CEX E221	CEX E246
215 mM	CEX E22	CEX E47	CEX E72	CEX E97	CEX E122	CEX E147	CEX E172	CEX E197	CEX E222	CEX E247
220 mM	CEX E23	CEX E48	CEX E73	CEX E98	CEX E123	CEX E148	CEX E173	CEX E198	CEX E223	CEX E248
225 mM	CEX E24	CEX E49	CEX E74	CEX E99	CEX E124	CEX E149	CEX E174	CEX E199	CEX E224	CEX E249
230 mM	CEX E25	CEX E50	CEX E75	CEX E100	CEX E125	CEX E150	CEX E175	CEX E200	CEX E225	CEX E250

【0143】 在一些實施例中，所述條件選自CEX E1至CEX E25；在一些實施例中，所述條件選自CEX E26至CEX E50；在一些實施例中，所述條件選自CEX E51至CEX E75；在一些實施例中，所述條件選自CEX E76至CEX E100；在一些實施例中，所述條件選自CEX E101至CEX E125；在一些實施例中，所述條件選自CEX E126至CEX E150；在一些實施例中，所述條件選自CEX E151至CEX E175；

在一些實施例中，所述條件選自CEX E176至CEX E200；在一些實施例中，所述條件選自CEX E201至CEX E225；在一些實施例中，所述條件選自CEX E226至CEX E250。在一些實施例中，所述條件選自CEX E36、CEX E61、CEX E86、CEX E111、CEX E37、CEX E62、CEX E87、CEX E112、CEX E38、CEX E63、CEX E88、CEX E113、CEX E39、CEX E64、CEX E89、CEX E114、CEX E40、CEX E65、CEX E90和CEX E115。在一些實施例中，所述條件選自CEX E66、CEX E91、CEX E116、CEX E67、CEX E92、CEX E117、CEX E68、CEX E93、CEX E118、CEX E69、CEX E94、CEX E119、CEX E70、CEX E95和CEX E120。在一些實施例中，所述條件選自CEX E141、CEX E166、CEX E191、CEX E142、CEX E167、CEX E192、CEX E143、CEX E168、CEX E193、CEX E144、CEX E169、CEX E194、CEX E145、CEX E170和CEX E195。在一些實施例中，所述條件選自CEX E136、CEX E161、CEX E186、CEX E137、CEX E162、CEX E187、CEX E138、CEX E163、CEX E188、CEX E139、CEX E164、CEX E189、CEX E140、CEX E165和CEX E190。

【0144】 在一些實施例中，所述CEX層析包括以下洗滌/溶析條件組合中的任一種：

(1)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；

(2)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；

(3)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；

(4) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中的任一種的CEX溶析條件；

(5) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中的任一種的CEX溶析條件；

(6) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；

(7) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；

(8) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中的任一種的CEX溶析條件；

(9) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件。

【0145】 如本文所述的CEX層析步驟可以在冷藏條件(例如 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)下或在環境溫度下進行。

【0146】 在一些實施例中，本揭露的方法進一步包括用於減少宿主細胞蛋白的固定化金屬親和層析(IMAC)。如本文所用，術語“IMAC”是指基於過渡金屬離子(如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+})在水溶液中對組胺酸或半胱胺酸的親和力的固相。IMAC的類型描述於Block等人, *Methods in Enzymology* (2009) 463:439-73中。在另外的實施例中，所述IMAC樹脂裝載有二價離子。在仍另外的實施例中，所述二價金屬離子是鎳、銅、鈷或鋅。在更具體的實施例中，所述二價金屬離子是鋅。

【0147】 在一些實施例中，所述IMAC層析包括 (1) 將包含rASM的液體組合物載入到IMAC層析膜或柱；(2) 用洗滌緩衝液洗滌所述IMAC層析膜或柱；(3)

用溶析緩衝液從所述IMAC層析膜或柱溶析rASM；以及 (4) 收集包含rASM的溶析液。

【0148】 在一些實施例中，使在所述CEX層析中獲得的溶析液以結合和溶析模式經受IMAC層析。

【0149】 在一些實施例中，所述IMAC包括 (1) 將包含rASM的組合物載入到IMAC層析膜或IMAC層析柱。在一些實施例中，所述組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種經修飾的rASM同功型，如本文所述。

【0150】 在一些實施例中，所述IMAC層析進一步包括 (2) 用具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的洗滌緩衝液洗滌所述膜或所述柱。所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述組合物的起始比活性預先確定的。在一些實施例中，所述洗滌緩衝液包含基於磷酸鹽(如磷酸鈉)的pH緩衝系統。在一些實施例中，所述磷酸鈉濃度為約1至100mM，如約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mM、約5 mM、約6 mM、約7 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM或約100 mM。在一些實施例中，所述第三最適鹽濃度和所述第三最適pH選自下表3中的條件。

表3. IMAC洗滌緩衝液的鹽(NaCl)/pH條件

	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2	pH 6.4	pH 6.6	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0	pH 7.1	pH 7.2
0 mM	IMAC W1	IMAC W26	IMAC W51	IMAC W76	IMAC W101	IMAC W126	IMAC W151	IMAC W176	IMAC W201	IMAC W226
2 mM	IMAC W2	IMAC W27	IMAC W52	IMAC W77	IMAC W102	IMAC W127	IMAC W152	IMAC W177	IMAC W202	IMAC W227
4 mM	IMAC W3	IMAC W28	IMAC W53	IMAC W78	IMAC W103	IMAC W128	IMAC W153	IMAC W178	IMAC W203	IMAC W228
6 mM	IMAC W4	IMAC W29	IMAC W54	IMAC W79	IMAC W104	IMAC W129	IMAC W154	IMAC W179	IMAC W204	IMAC W229
8	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC

	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2	pH 6.4	pH 6.6	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0	pH 7.1	pH 7.2
mM	W5	W30	W55	W80	W105	W130	W155	W180	W205	W230
10 mM	IMAC W6	IMAC W31	IMAC W56	IMAC W81	IMAC W106	IMAC W131	IMAC W156	IMAC W181	IMAC W206	IMAC W231
12 mM	IMAC W7	IMAC W32	IMAC W57	IMAC W82	IMAC W107	IMAC W132	IMAC W157	IMAC W182	IMAC W207	IMAC W232
14 mM	IMAC W8	IMAC W33	IMAC W58	IMAC W83	IMAC W108	IMAC W133	IMAC W158	IMAC W183	IMAC W208	IMAC W233
16 mM	IMAC W9	IMAC W34	IMAC W59	IMAC W84	IMAC W109	IMAC W134	IMAC W159	IMAC W184	IMAC W209	IMAC W234
18 mM	IMAC W10	IMAC W35	IMAC W60	IMAC W85	IMAC W110	IMAC W135	IMAC W160	IMAC W185	IMAC W210	IMAC W235
20 mM	IMAC W11	IMAC W36	IMAC W61	IMAC W86	IMAC W111	IMAC W136	IMAC W161	IMAC W186	IMAC W211	IMAC W236
25 mM	IMAC W12	IMAC W37	IMAC W62	IMAC W87	IMAC W112	IMAC W137	IMAC W162	IMAC W187	IMAC W212	IMAC W237
30 mM	IMAC W13	IMAC W38	IMAC W63	IMAC W88	IMAC W113	IMAC W138	IMAC W163	IMAC W188	IMAC W213	IMAC W238
35 mM	IMAC W14	IMAC W39	IMAC W64	IMAC W89	IMAC W114	IMAC W139	IMAC W164	IMAC W189	IMAC W214	IMAC W239
40 mM	IMAC W15	IMAC W40	IMAC W65	IMAC W90	IMAC W115	IMAC W140	IMAC W165	IMAC W190	IMAC W215	IMAC W240
45 mM	IMAC W16	IMAC W41	IMAC W66	IMAC W91	IMAC W116	IMAC W141	IMAC W166	IMAC W191	IMAC W216	IMAC W241
50 mM	IMAC W17	IMAC W42	IMAC W67	IMAC W92	IMAC W117	IMAC W142	IMAC W167	IMAC W192	IMAC W217	IMAC W242
55 mM	IMAC W18	IMAC W43	IMAC W68	IMAC W93	IMAC W118	IMAC W143	IMAC W168	IMAC W193	IMAC W218	IMAC W243
60 mM	IMAC W19	IMAC W44	IMAC W69	IMAC W94	IMAC W119	IMAC W144	IMAC W169	IMAC W194	IMAC W219	IMAC W244
65 mM	IMAC W20	IMAC W45	IMAC W70	IMAC W95	IMAC W120	IMAC W145	IMAC W170	IMAC W195	IMAC W220	IMAC W245
70 mM	IMAC W21	IMAC W46	IMAC W71	IMAC W96	IMAC W121	IMAC W146	IMAC W171	IMAC W196	IMAC W221	IMAC W246
75 mM	IMAC W22	IMAC W47	IMAC W72	IMAC W97	IMAC W122	IMAC W147	IMAC W172	IMAC W197	IMAC W222	IMAC W247
80 mM	IMAC W23	IMAC W48	IMAC W73	IMAC W98	IMAC W123	IMAC W148	IMAC W173	IMAC W198	IMAC W223	IMAC W248
85 mM	IMAC W24	IMAC W49	IMAC W74	IMAC W99	IMAC W124	IMAC W149	IMAC W174	IMAC W199	IMAC W224	IMAC W249
90 mM	IMAC W25	IMAC W50	IMAC W75	IMAC W100	IMAC W125	IMAC W150	IMAC W175	IMAC W200	IMAC W225	IMAC W250

【0151】 一般而言，IMAC洗滌緩衝液中較低的pH和/或較高的鹽濃度導致較高的純度(例如較高的HCP清除率)，但導致較低的比活性和較低的回收率。因此，根據目標純度和比活性，IMAC洗滌條件可以選自IMAC W1至IMAC W250。

在一些實施例中，所述條件選自IMAC W1至IMAC W25；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W26至IMAC W50；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W51至IMAC W75；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W76至IMAC W100；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W101至IMAC W125；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W126至IMAC W150；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W151至IMAC W175；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W176至IMAC W200；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W201至IMAC W225；在一些實施例中，所述條件選自IMAC W226至IMAC W250。在一些實施例中，所述條件選自IMAC W1、IMAC W26、IMAC W51、IMAC W76、IMAC W101、IMAC W2、IMAC W27、IMAC W52、IMAC W77、IMAC W102、IMAC W3、IMAC W28、IMAC W53、IMAC W78、IMAC W103、IMAC W4、IMAC W29、IMAC W54、IMAC W79、IMAC W104、IMAC W5、IMAC W30、IMAC W55、IMAC W80、IMAC W105。在一些實施例中，所述條件選自IMAC W126、IMAC W151、IMAC W176、IMAC W201、IMAC W226、IMAC W127、IMAC W152、IMAC W177、IMAC W202、IMAC W227、IMAC W128、IMAC W153、IMAC W178、IMAC W203、IMAC W228、IMAC W129、IMAC W154、IMAC W179、IMAC W204、IMAC W229、IMAC W130、IMAC W155、IMAC W180、IMAC W205和IMAC W230。在一些實施例中，所述條件選自IMAC W6、IMAC W31、IMAC W56、IMAC W81、IMAC W106、IMAC W7、IMAC W32、IMAC W57、IMAC W82、IMAC W107、IMAC W8、IMAC W33、IMAC W58、IMAC W83、IMAC W108、IMAC W9、IMAC W34、IMAC W59、IMAC W84、IMAC W109、IMAC W10、IMAC W35、IMAC W60、IMAC W85和IMAC W110。在一些實施例中，所述條件選自IMAC W131、IMAC W156、IMAC

W181、IMAC W206、IMAC W231、IMAC W132、IMAC W157、IMAC W182、IMAC W207、IMAC W232、IMAC W133、IMAC W158、IMAC W183、IMAC W208、IMAC W233、IMAC W134、IMAC W159、IMAC W184、IMAC W209、IMAC W234、IMAC W135、IMAC W160、IMAC W185、IMAC W210和IMAC W235。

【0152】 任選地，所述IMAC層析包括其他洗滌步驟(IMAC洗滌2)。在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括使用比所述第一IMAC洗滌步驟中使用的pH低的pH。在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括使用比所述第一IMAC洗滌步驟中使用的pH低約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0或約1.2的pH。在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括使用與所述第一IMAC洗滌步驟中使用的鹽條件相同或相近的鹽條件。在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括比所述第一次洗滌高的鹽濃度(例如NaCl)。在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括至少0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、12 mM、14 mM、16 mM、18 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM、100 mM、105 mM、110 mM、120 mM、130 mM、140 mM、150 mM或更高的氯化鈉濃度。

【0153】 在一些實施例中，所述第二洗滌步驟包括使用與第一IMAC洗滌步驟中使用的鹽濃度相同或相近的鹽濃度的洗滌緩衝液。

【0154】 在一些實施例中，所述IMAC層析進一步包括(3)用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的溶析緩衝液洗滌所述膜或所述柱。在一些實施例中，所述溶析緩衝液包含基於磷酸鹽(如磷酸鈉)的pH緩衝系統。在一些實施例中，所述

磷酸鈉濃度為約5至100 mM，如約5 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM或約100 mM。在一些實施例中，所述磷酸鈉濃度與IMAC洗滌緩衝液中的磷酸鈉濃度相同或相似。在一些實施例中，所述第四最適鹽濃度和所述第四最適pH是根據所述IMAC洗滌緩衝液中的第三最適鹽濃度和第三最適pH預先確定的。

【0155】 在一些實施例中，所述第四最適鹽濃度和所述第四最適pH選自下表4中的條件。

表4. IMAC溶析緩衝液的鹽(NaCl)/pH條件

	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0	pH 7.1	pH 7.2
0.1 M	IMAC E1	IMAC E26	IMAC E51	IMAC E76	IMAC E101	IMAC E126	IMAC E151	IMAC E176	IMAC E201	IMAC E226
0.2 M	IMAC E2	IMAC E27	IMAC E52	IMAC E77	IMAC E102	IMAC E127	IMAC E152	IMAC E177	IMAC E202	IMAC E227
0.3 M	IMAC E3	IMAC E28	IMAC E53	IMAC E78	IMAC E103	IMAC E128	IMAC E153	IMAC E178	IMAC E203	IMAC E228
0.4 M	IMAC E4	IMAC E29	IMAC E54	IMAC E79	IMAC E104	IMAC E129	IMAC E154	IMAC E179	IMAC E204	IMAC E229
0.5 M	IMAC E5	IMAC E30	IMAC E55	IMAC E80	IMAC E105	IMAC E130	IMAC E155	IMAC E180	IMAC E205	IMAC E230
0.6 M	IMAC E6	IMAC E31	IMAC E56	IMAC E81	IMAC E106	IMAC E131	IMAC E156	IMAC E181	IMAC E206	IMAC E231
0.7 M	IMAC E7	IMAC E32	IMAC E57	IMAC E82	IMAC E107	IMAC E132	IMAC E157	IMAC E182	IMAC E207	IMAC E232
0.8 M	IMAC E8	IMAC E33	IMAC E58	IMAC E83	IMAC E108	IMAC E133	IMAC E158	IMAC E183	IMAC E208	IMAC E233
0.9 M	IMAC E9	IMAC E34	IMAC E59	IMAC E84	IMAC E109	IMAC E134	IMAC E159	IMAC E184	IMAC E209	IMAC E234
1.0 M	IMAC E10	IMAC E35	IMAC E60	IMAC E85	IMAC E110	IMAC E135	IMAC E160	IMAC E185	IMAC E210	IMAC E235
1.1 M	IMAC E11	IMAC E36	IMAC E61	IMAC E86	IMAC E111	IMAC E136	IMAC E161	IMAC E186	IMAC E211	IMAC E236
1.2 M	IMAC E12	IMAC E37	IMAC E62	IMAC E87	IMAC E112	IMAC E137	IMAC E162	IMAC E187	IMAC E212	IMAC E237
1.3 M	IMAC E13	IMAC E38	IMAC E63	IMAC E88	IMAC E113	IMAC E138	IMAC E163	IMAC E188	IMAC E213	IMAC E238
1.4 M	IMAC E14	IMAC E39	IMAC E64	IMAC E89	IMAC E114	IMAC E139	IMAC E164	IMAC E189	IMAC E214	IMAC E239
1.5 M	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC	IMAC

	pH 6.3	pH 6.4	pH 6.5	pH 6.6	pH 6.7	pH 6.8	pH 6.9	pH 7.0	pH 7.1	pH 7.2
M	E15	E40	E65	E90	E115	E140	E165	E190	E215	E240
1.6 M	IMAC E16	IMAC E41	IMAC E66	IMAC E91	IMAC E116	IMAC E141	IMAC E166	IMAC E191	IMAC E216	IMAC E241
1.7 M	IMAC E17	IMAC E42	IMAC E67	IMAC E92	IMAC E117	IMAC E142	IMAC E167	IMAC E192	IMAC E217	IMAC E242
1.8 M	IMAC E18	IMAC E43	IMAC E68	IMAC E93	IMAC E118	IMAC E143	IMAC E168	IMAC E193	IMAC E218	IMAC E243
1.9 M	IMAC E19	IMAC E44	IMAC E69	IMAC E94	IMAC E119	IMAC E144	IMAC E169	IMAC E194	IMAC E219	IMAC E244
2.0 M	IMAC E20	IMAC E45	IMAC E70	IMAC E95	IMAC E120	IMAC E145	IMAC E170	IMAC E195	IMAC E220	IMAC E245
2.1 M	IMAC E21	IMAC E46	IMAC E71	IMAC E96	IMAC E121	IMAC E146	IMAC E171	IMAC E196	IMAC E221	IMAC E246
2.2 M	IMAC E22	IMAC E47	IMAC E72	IMAC E97	IMAC E122	IMAC E147	IMAC E172	IMAC E197	IMAC E222	IMAC E247
2.3 M	IMAC E23	IMAC E48	IMAC E73	IMAC E98	IMAC E123	IMAC E148	IMAC E173	IMAC E198	IMAC E223	IMAC E248
2.4 M	IMAC E24	IMAC E49	IMAC E74	IMAC E99	IMAC E124	IMAC E149	IMAC E174	IMAC E199	IMAC E224	IMAC E249
2.5 M	IMAC E25	IMAC E50	IMAC E75	IMAC E100	IMAC E125	IMAC E150	IMAC E175	IMAC E200	IMAC E225	IMAC E250

【0156】 根據目標純度和比活性，IMAC溶析條件可以選自IMAC E1至IMAC E250。在一些實施例中，所述條件選自IMAC E1至IMAC E25；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E26至IMAC E50；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E51至IMAC E75；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E76至IMAC E100；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E101至IMAC E125；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E126至IMAC E150；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E151至IMAC E175；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E176至IMAC E200；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E201至IMAC E225；在一些實施例中，所述條件選自IMAC E226至IMAC E250。在一些實施例中，所述條件選自IMAC E13、IMAC E38、IMAC E63、IMAC E88、IMAC E113、IMAC E14、IMAC E39、IMAC E64、IMAC E89、IMAC E114、IMAC E15、IMAC E40、IMAC E65、IMAC E90、IMAC E115、IMAC E16、IMAC E41、IMAC E66、IMAC E91、IMAC

E116、IMAC E17、IMAC E42、IMAC E67、IMAC E92、IMAC E117、IMAC E18、IMAC E43、IMAC E68、IMAC E93和IMAC E118。在一些實施例中，所述條件選自IMAC E138、IMAC E163、IMAC E188、IMAC E213、IMAC E238、IMAC E139、IMAC E164、IMAC E189、IMAC E214、IMAC E239、IMAC E140、IMAC E165、IMAC E190、IMAC E215、IMAC E240、IMAC E141、IMAC E166、IMAC E191、IMAC E216、IMAC E241、IMAC E142、IMAC E167、IMAC E192、IMAC E217和IMAC E242。在一些實施例中，所述條件選自IMAC E19、IMAC E44、IMAC E69、IMAC E94、IMAC E119、IMAC E20、IMAC E45、IMAC E70、IMAC E95、IMAC E120、IMAC E21、IMAC E46、IMAC E71、IMAC E96、IMAC E121、IMAC E22、IMAC E47、IMAC E72、IMAC E97、IMAC E122、IMAC E23、IMAC E48、IMAC E73、IMAC E98和IMAC E123。在一些實施例中，所述條件選自IMAC E143、IMAC E168、IMAC E193、IMAC E218、IMAC E243、IMAC E144、IMAC E169、IMAC E194、IMAC E219、IMAC E244、IMAC E145、IMAC E170、IMAC E195、IMAC E220、IMAC E245、IMAC E146、IMAC E171、IMAC E196、IMAC E221、IMAC E246、IMAC E147、IMAC E172、IMAC E197、IMAC E222和IMAC E247。

【0157】 在一些實施例中，所述IMAC包括以下洗滌/溶析條件組合中的任一種：

(1)IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(2)IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(3)IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(4)IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(5)IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(6)IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(7)IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(8)IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(9)IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件。

【0158】 如本文所述的IMAC步驟可以在冷藏條件(例如 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)下或在環境溫度下進行。

【0159】 在一些實施例中，如本文所述的方法串聯地或分別地包括CEX層析和IMAC兩者(不管CEX層析和IMAC的順序如何)，其中所述方法包括以下洗滌/溶析條件中的任一種：

(1)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(2)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(3)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(4)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(5)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(6)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(7)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(8)CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(9) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(10) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；

(11) IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(12) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(13) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(14) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(15) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(16) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(17) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(18) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(19) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(20) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(21) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(22) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(23) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(24) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX

E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(25) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(26) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(27) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(28) CEX W1至CEX W25中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(29) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(30) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(31) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件

件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(32) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(33) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(34) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(35) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(36) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(37) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(38) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(39) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(40) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(41) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(42) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(43) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(44) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(45) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(46) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至

CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(47) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(48) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(49) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(50) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(51) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(52) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(53) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的

IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(54) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(55) CEX W101至CEX W125中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(56) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(57) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(58) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(59) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(60) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(61) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(62) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(63) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(64) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E1至CEX E25中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(65) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(66) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(67) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(68) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至

CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(69) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(70) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(71) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(72) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(73) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E101至CEX E125中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(74) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(75) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC

洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(76) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W1至IMAC W25中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(77) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(78) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(79) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W76至IMAC W100中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件；

(80) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E51至IMAC E75中任一種的IMAC溶析條件；

(81) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E126至IMAC E150中任一種的IMAC溶析條件；

(82) CEX W226至CEX W250中任一種的CEX洗滌條件，和CEX E226至CEX E250中任一種的CEX溶析條件；IMAC W176至IMAC W200中任一種的IMAC洗滌條件，和IMAC E226至IMAC E250中任一種的IMAC溶析條件。

重組酸性鞘磷脂酶組合物

【0160】 本揭露提供了包含重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的組合物。在一些實施例中，所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。在一些實施例中，所述rhASM是奧利普酶 α 。在一些實施例中，所述rhASM包含具有SEQ ID NO: 1、2、3、4、5或6的多肽。在一些實施例中，所述rhASM包含與SEQ ID NO: 1-6中任一具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高同一性的多肽或其混合物。

【0161】 在一些實施例中，如本文所述的組合物是醫藥組合物。在一些實施例中，根據本文所述的方法配製所述醫藥組合物。在一些實施例中，所述組合物呈液體配製品形式。在一些實施例中，所述組合物是凍乾配製品。

【0162】 在一些實施例中，所述組合物是rASM製劑，如rhASM製劑。在一些實施例中，所述製劑是準備用於治療用途或商業銷售的最終產物。在一些實施例中，所述製劑是用於下游製造的中間產物。

【0163】 在一些實施例中，本揭露提供了含有本文所述的組合物的容器(例如，小瓶)。

【0164】 在一些實施例中，本揭露的組合物含有rhASM並且展現出優異的rhASM同功型一致性和純度，具有控制良好的比活性。

【0165】 在一些實施例中，本揭露的rASM組合物的純度為至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95.0%、至少95.5%、

至少96.0%、至少96.5%、至少97.0%、至少97.5%、至少98.0%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%或更高。本揭露的組合物的純度可以通過本領域已知的合適的方法測定。在一些實施例中，通過HPLC(如RP-HPLC)測定純度。

【0166】 在一些實施例中，本揭露的rASM組合物具有未經修飾的rASM同功型，其佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多。在一些實施例中，所述rASM組合物中的未經修飾的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多。在一些實施例中，所有經修飾的rASM同功型總共佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過50%、不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【0167】 在一些實施例中，具有C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過50%、不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過19%、不超過18%、不超過17%、不超過16%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、

不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【0168】 在一些實施例中，具有C末端S-羧基甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過50%、不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%或不超過1%。在一些實施例中，所述具有C末端S-羧基甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%或更少。

【0169】 在一些實施例中，具有C末端二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過20%、不超過19%、不超過18%、不超過17%、不超過16%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%、不超過0.9%、不超過0.8%、不超過0.7%、不超過0.6%、不超過0.5%、不超過0.4%、不超過0.3%或不超過0.2%。在一些實施例中，具有C末端二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過0.1%。具有C末端二聚化的同功型包括但不限於表1中描述的那些。

【0170】 在一些實施例中，具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總群體rASM的不超過50%、不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%。在一些實施例中，具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%或更少。具有C末端截

短的同功型包括但不限於表1中描述的那些。

【0171】 所述rASM組合物的比活性為約5 U/mg、約6 U/mg、約7 U/mg、約8 U/mg、約9 U/mg、約10 U/mg、約11 U/mg、約12 U/mg、約13 U/mg、約14 U/mg、約15 U/mg、約16 U/mg、約17 U/mg、約18 U/mg、約19 U/mg、約20 U/mg、約21 U/mg、約22 U/mg、約23 U/mg、約24 U/mg、約25 U/mg、約26 U/mg、約27 U/mg、約28 U/mg、約29 U/mg、約30 U/mg、約31 U/mg、約32 U/mg、約33 U/mg、約34 U/mg、約35 U/mg、約36 U/mg、約37 U/mg、約38 U/mg、約39 U/mg、約40 U/mg、約41 U/mg、約42 U/mg、約43 U/mg、約44 U/mg、約45 U/mg、約46 U/mg、約47 U/mg、約48 U/mg、約49 U/mg或約50 U/mg。在一些實施例中，所述比活性為約5至50 U/mg。在一些實施例中，所述比活性為約10至40 U/mg。在一些實施例中，所述比活性為約10至30 U/mg。在一些實施例中，所述比活性為約10至20 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑中的比活性為約5-50 U/mg，如約10-40 U/mg、約15-45 U/mg、約10-30 U/mg、約15-35 U/mg或約10-20 U/mg。在一些實施例中，所獲得的rASM製劑中的比活性為約5 U/mg、約10 U/mg、約15 U/mg、約20 U/mg、約25 U/mg、約30 U/mg、約35 U/mg、約40 U/mg、約45 U/mg，或約50 U/mg。所述rASM組合物的比活性可以通過本領域已知的合適方法測定。在一些實施例中，所述rASM組合物的比活性是通過如實例4所述的測定確定的。

【0172】 如本文所述的重組ASM組合物的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過5.0 µg/mg。在一些實施例中，所述rASM組合物的HCP水平不超過5.0 µg/mg、不超過4.5 µg/mg、不超過4.0 µg/mg、不超過3.5 µg/mg、不超過3.0 µg/mg、不超過2.5 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過1.5 µg/mg、不超過1.0 µg/mg、不超過0.9 µg/mg、

不超過0.8 µg/mg、不超過0.7 µg/mg、不超過0.6 µg/mg、不超過0.5 µg/mg或更少。

【0173】 在一些實施例中，本揭露的rASM組合物可以具有至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個或至少八個選自以下的特徵：

(1)純度為至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95.0%、至少95.5%、至少96.0%、至少96.5%、至少97.0%、至少97.5%、至少98.0%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%或更高；

(2)所述rASM組合物中未經修飾的rASM同功型佔總rASM群體的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多；

(3)包含C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔總rASM群體的不超過20%、不超過19%、不超過18%、不超過17%、不超過16%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少；

(4)包含C末端S-麩胱甘肽化的rASM同功型佔總rASM群體的不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%或更少；

(5)包含C末端二聚化的rASM同功型佔總rASM群體的不超過2%、不超過1.9%、不超過1.8%、不超過1.7%、不超過1.6%、不超過1.5%、不超過1.4%、不

超過1.3%、不超過1.2%、不超過1.1%、不超過1.0%、不超過0.9%、不超過0.8%、
不超過0.7%、不超過0.6%、不超過0.5%、不超過0.4%、不超過0.3%、不超過0.2%
或不超過0.1%；

(6)包含C末端截短的rASM同功型佔總rASM群體的不超過20%、不超過19%、
不超過18%、不超過17%、不超過16%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、
不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不
超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%或更少；

(7)比活性為約10至50 U/mg、約15至35 U/mg、約10至30 U/mg或約10至20
U/mg；以及

(8)宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過5.0 µg/mg、不超過4.5 µg/mg、不超過4.0
µg/mg、不超過3.5 µg/mg、不超過2.0 µg/mg、不超過1.5 µg/mg、不超過1.0 µg/mg、
不超過0.5 µg/mg或更少。

【0174】 在一些實施例中，如本文所述的包含重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的
組合物是通過使用如本文所述的方法純化在宿主細胞中表現的rASM來產生的。
特別地，如本文所述的包含rASM的組合物是通過包括如本文所述的純化方法在
內的方法產生的。在另外的實施例中，使用如本文所述的CEX層析純化如本文
所述的包含rASM的組合物。在另外的實施例中，使用如本文所述的CEX層析和
/或IMAC純化如本文所述的包含rASM的組合物。

包含純化的rhASM的配製的醫藥組合物

【0175】 本揭露還提供了包含如本文所述的純化的rASM(例如rhASM)的
醫藥組合物。在一些實施例中，所述醫藥組合物是通過配製如本文所述的rASM
製劑來製備的。在一些實施例中，所述配製過程不改變或不顯著改變所述rASM

製劑中rASM的比活性和/或所述製劑中rASM同功型的相關比率。例如，在配製過程後，組合物中rASM的比活性為配製過程前所述比活性的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少1x、至少2x、至少3x、至少4x、至少5x、至少6x、至少7x、至少8x、至少9x、至少10x、至少15x、至少20x、至少30x、至少40x、至少50x或更高。

【0176】 在一些實施例中，本發明的組合物含有一種或多種醫藥上可接受的賦形劑。“賦形劑”是指用作藥物的一種或多種活性成分的稀釋劑、媒劑、載劑、防腐劑、粘結劑或穩定劑的惰性物質。例如，所述組合物可以含有緩衝劑、等滲劑和/或穩定劑(如抗氧化劑)。在一些情況下，一種試劑可以用於不止一個的這些目的。在一些實施例中，本發明的組合物含有重組人ASM(如奧利普酶 α)、緩衝劑(如磷酸鈉或檸檬酸鈉)、穩定劑(如L-甲硫胺酸)和非還原糖(如蔗糖或海藻糖)。由於所述組合物中的特定組成，人類ASM具有改善的穩定性。本發明的組合物可以是水性液體溶液或凍乾製劑。

【0177】 在一些實施例中，所述組合物是水性液體組合物，其包含1-10 mg/mL(例如，3-5 mg/mL) rhASM(例如，奧利普酶 α)；10-50 mM(例如，10-30 mM) 磷酸鈉；70-150 mM(例如，80-120 mM)甲硫胺酸(例如，L-甲硫胺酸)；和1%-10%(例如，4%-6%)w/v蔗糖或海藻糖。所述水性液體組合物的pH可以是5-8(例如，6-7)。

【0178】 在一些實施例中，所述水性液體組合物不包含可檢測量的甘露糖醇(最容易使用的結晶賦形劑)，因為它可以在凍乾本文所述的水性液體組合物期間或之後顯著增加人ASM的聚集。

【0179】 在一些實施例中，所述水性液體組合物包含0.004%-0.008%、

0.005%-0.007%或0.005% w/v的一種或多種表面活性劑。例示性的表面活性劑包括非離子型去污劑，如聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20和80)和泊洛沙姆(例如，泊洛沙姆188)。在具體的實施例中，所述水性液體組合物包含0.005%聚山梨醇酯80。在一些情況下，一種或多種表面活性劑的存在可以說明降低液體組合物中的濁度。

【0180】 在一些實施例中，所述水性液體組合物包含不超過0.05、0.01或0.005 mM的一種或多種螯合劑，如EDTA和EGTA；在例示性實施例中，所述水性液體組合物不包含可檢測量的一種或多種螯合劑。一些在情況下，濃度高於例如0.05 mM或0.1 mM的螯合劑的存在可能增加人ASM的聚集並降低其穩定性，特別是在延長的儲存時間例如12-16週之後，或在非冷藏條件下例如在25°C下。在一些實施例中，所述水性液體組合物可以含有0-50 ppm(例如15-30 ppm)的鋅，其可以例如從製造過程攜帶或從外部添加。

【0181】 在具體的實施例中，所述水性液體組合物包含4 mg/mL奧利普酶 α 、20 mM磷酸鈉、100 mM甲硫胺酸和5%(w/v)蔗糖或基本上由其組成並且具有6.5的pH。術語“基本上由.....組成”意指組合物不含有可檢測量的其他成分，或可以僅含有痕量的某些材料，所述材料是從蛋白質製造過程中衍生出來的，其中此類材料在人類患者中不會影響酶的生物活性或引起傷害。

【0182】 在一些實施例中，所述組合物是水性液體組合物，其包含1-20 mg/mL(例如，10 mg/mL)rhASM(例如，奧利普酶 α)和10-50 mM(例如，20 mM)磷酸鈉。在某些實施例中，所述水性液體組合物進一步包含甲硫胺酸(例如，L-甲硫胺酸)和蔗糖或海藻糖。在某些實施例中，所述水性液體組合物進一步包含80-120 mM(例如，100 mM)甲硫胺酸和4%-6%(例如，5%)(w/v)蔗糖。在具體的

實施例中，所述水性液體組合物具有6.5的pH。

【0183】 在一些實施例中，所述組合物是水性液體組合物，其包含1-50 mg/mL(例如，3.8、18或49 mg/mL)rhASM(例如，奧利普酶 α)和10-50 mM(例如，20 mM)磷酸鈉。在某些實施例中，所述水性液體組合物進一步包含1%-15%(例如，5%、6%、7%或8%)蔗糖或海藻糖。在某些實施例中，所述水性液體組合物進一步包含80-120 mM(例如100 mM)甲硫胺酸。在具體的實施例中，所述水性液體組合物具有6.5的pH。所述組合物可以包含例如3.8 mg/mL rhASM、20 mM磷酸鈉和5%蔗糖；18 mg/mL rhASM、20 mM磷酸鈉和5%蔗糖；或49 mg/mL rhASM、20 mM磷酸鹽和8%蔗糖。

【0184】 所述水性液體組合物可以通過這樣的方式製備：將通過重組技術產生並且隨後從宿主細胞純化的人ASM與本文所述的賦形劑在水中混合，並且將所得的混合物調節至所需pH。例如，可以將人ASM和所需賦形劑添加到或緩衝液交換到具有所需的磷酸鈉濃度和pH的磷酸鈉緩衝液中。

【0185】 在一些實施例中，所述水性液體組合物可以通過下文進一步詳細描述的重構本發明的凍乾組合物來製備。可以用醫藥上可接受的液體(如無菌水、鹽水(例如，0.9%氯化鈉)或磷酸鹽緩衝鹽水)來完成重構。

【0186】 本發明還提供了凍乾組合物。此類組合物可以通過凍乾本文所述的水性液體組合物來製備。凍乾組合物適合於長期儲存。可以根據本領域已知的方法進行凍乾。例如，可以將液體組合物冷卻至允許冷凍的低於零度(攝氏度)溫度(例如，-5°C至-80°C)，然後將其置於低壓(部分真空)室內以允許發生昇華(初步乾燥)；如果需要，可以在乾燥的第二階段(二次乾燥)中使組合物的溫度升高，以進一步去除不必要的水分子。在一些實施例中，在凍乾過程完成之後，可以

在密封容器之前將惰性氣體(如氮氣)引入組合物的容器(例如，玻璃小瓶)中。

【0187】 在一些實施例中，本發明提供了粉末狀組合物，其可以例如通過噴霧乾燥本文所述的水性液體組合物來製備。噴霧乾燥組合物適合於長期儲存。可以根據本領域已知的方法進行噴霧乾燥。例如，可以迫使液體組合物通過霧化器或噴嘴，以將其作為受控尺寸的小液滴分散到室內的熱氣流中，從而使液體組合物快速乾燥成粉末。然後可以將乾燥的粉末收集在乾燥室的底部。也考慮了用於製備粉末狀組合物的其他乾燥方法。

【0188】 在凍乾期間以本文所述的量存在的蔗糖(或海藻糖)和甲硫胺酸提供了優異的結果；凍乾產物形成優雅的餅，同時在儲存期間保持人ASM的穩定性。在冷藏條件下(例如，在0°C-10°C、2°C-8°C或4°C下)，本發明的凍乾組合物中的人ASM可以保持無聚集和有生物學活性至少4個月(例如，至少6個月或至少12個月)。

【0189】 在一些實施例中，本發明的組合物是凍乾醫藥組合物，其包含4%-50%奧利普酶 α 、3%-7%磷酸鈉和45%-90%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在某些實施例中，所述凍乾組合物包含5.5%奧利普酶 α 、20.6% L-甲硫胺酸、2.3%磷酸氫二鈉七水合物、2.6%磷酸二氫鈉一水合物和69.0%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在某些實施例中，所述凍乾組合物包含6.6%奧利普酶 α 、3.0%磷酸氫二鈉七水合物、3.3%磷酸二氫鈉一水合物和87.1%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在某些實施例中，所述凍乾組合物包含25.2%奧利普酶 α 、2.4%磷酸氫二鈉七水合物、2.6%磷酸二氫鈉一水合物和69.9%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在某些實施例中，所述凍乾組合物包含47.8%奧利普酶 α 、1.7%磷酸氫二鈉七水合物、1.8%磷酸二氫鈉一水合物和48.8%蔗糖(全部都是w/w百分比)。

【0190】 在一些實施例中，本發明的組合物是凍乾醫藥組合物，其包含4%-7%奧利普酶 α 、15-25% L-甲硫胺酸、3%-7%磷酸鈉和65%-75%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在具體的實施例中，所述凍乾組合物包含5.5%奧利普酶 α 、20.5% L-甲硫胺酸、2.3%磷酸氫二鈉七水合物、2.6%磷酸二氫鈉一水合物和68.6%蔗糖(全部都是w/w百分比)。在某些實施例中，所述凍乾組合物還可以包含例如0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或1.0%水分。

【0191】 在一些實施例中，本發明提供了含有凍乾醫藥組合物的瓶，所述凍乾醫藥組合物包含15-25 mg奧利普酶 α 、75-85 mg L-甲硫胺酸、15-25 mg磷酸鈉和250-300 mg蔗糖。在使用之前，可以在4-6 mL的無菌水中重構所述組合物。

【0192】 在一些實施例中，所述瓶含有凍乾醫藥組合物，所述凍乾醫藥組合物包含21.2 mg、20.1 mg、95.4 mg或259.7 mg奧利普酶 α ；9.0 mg磷酸氫二鈉七水合物；10.0 mg磷酸二氫鈉一水合物；和265 mg蔗糖或由其組成。所述凍乾組合物可以任選地包含79.1 mg L-甲硫胺酸。所述凍乾醫藥組合物可以任選地包含0-0.3 mg(例如，0.08-0.16 mg)鋅，其可以例如從製造過程中攜帶或從外部添加。在某些實施例中，所述瓶可以具有內部無菌的氮氣填充氣氛。在具體的實施例中，可以在5.1 mL的無菌水中重構所述凍乾組合物以分別產生約4.0 mg/mL、3.8 mg/mL、18 mg/mL或49 mg/mL的奧利普酶 α 濃度。基於待給予的劑量，所述重構的組合物可以進一步在0.9%氯化鈉溶液中稀釋至特定的體積。

【0193】 在具體的實施例中，所述瓶含有凍乾醫藥組合物，所述凍乾醫藥組合物包含21.2 mg奧利普酶 α 、79 mg L-甲硫胺酸、9.0 mg磷酸氫二鈉七水合物、10.0 mg磷酸二氫鈉一水合物和265 mg蔗糖或由其組成。所述凍乾醫藥組合

物可以任選地包含0-0.3 mg(例如，0.08-0.16 mg)鋅，其可以例如從製造過程中攜帶或從外部添加。在某些實施例中，所述凍乾醫藥組合物呈餅或凍乾粉末的形式。在某些實施例中，所述小瓶可以具有內部無菌的氮氣填充氣氛。在具體的實施例中，可以在5.1 mL的無菌水中重構所述凍乾組合物以產生約4.0 mg/mL的奧利普酶 α 濃度。基於待給予的劑量，所述重構的組合物可以進一步在0.9%氯化鈉溶液中稀釋至特定的體積。

【0194】 在一些實施例中，本發明提供了含有凍乾醫藥組合物的瓶，所述凍乾醫藥組合物包含3-5 mg奧利普酶 α 、15-17 mg L-甲硫胺酸、3-5 mg磷酸鈉和50-60 mg蔗糖。在使用之前，可以在0.8-1.2 mL的無菌水中重構所述組合物。

【0195】 在具體的實施例中，所述小瓶含有凍乾醫藥組合物，所述凍乾醫藥組合物包含4.8 mg奧利普酶 α 、17.9 mg L-甲硫胺酸、2.0 mg磷酸氫二鈉七水合物、2.3 mg磷酸二氫鈉一水合物和60 mg蔗糖或由其組成。在某些實施例中，所述凍乾醫藥組合物呈餅或凍乾粉末的形式。所述凍乾組合物可以任選地包含0-0.06 mg鋅，其可以例如從製造過程中攜帶或從外部添加。在某些實施例中，所述小瓶可以具有內部無菌的氮氣填充氣氛。在具體的實施例中，可以在1.1 mL的無菌水中重構所述凍乾組合物以產生約4.0 mg/mL的奧利普酶 α 濃度。基於待給予的劑量，所述重構的組合物可以進一步在0.9%氯化鈉溶液中稀釋至特定的體積。

製品

【0196】 通過本文所述的方法純化的rASM和/或包含通過本文所述的方法純化的rASM的配製品可以包括在製品內。所述製品可以包含含有所述rASM和/或所述rASM配製品的容器。在某些實施例中，所述製品包含：(a) 容器，在所述

容器內包含含有本文所述的rASM和/或rASM配製品的組合物；和 (b) 藥品說明書，所述藥品說明書具有用於向個體投予所述配製品的說明書。

【0197】 所述製品包含容器以及在所述容器上或與所述容器相關聯的標籤或包裝說明書。合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射筒等。容器可以由多種材料如玻璃或塑膠形成。所述容器保持或含有配製品並且可以具有無菌接入埠(例如容器可以是靜脈注射液袋或帶有可通過皮下注射針刺穿的塞子的小瓶)。所述組合物中的至少一種活性劑是所述多肽。標籤或藥品說明書指示所述組合物在個體中的使用，以及關於所提供的多肽和任何其他藥物的給藥量和間隔的具體指導。所述製品可以進一步包含從商業和用戶角度所需的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針和注射筒。在一些實施例中，所述容器是注射筒。在一些實施例中，所述注射筒被進一步包含在注射裝置內。在一些實施例中，所述注射裝置是自動注射器。

【0198】 “藥品說明書”用於指通常包括在治療性產品的商業包裝中的說明書，所述說明書包含關於使用此類治療性產品的適應證、用法、劑量、投予、禁忌證、待與包裝產品組合的其他治療性產品和/或警告的資訊。

實例

【0199】 提出以下實例以向一般熟習此項技術者提供關於如何製備和使用本發明中表徵的方法和組合物的完整公開內容和描述，並且不旨在限制諸位發明人視為其發明的範圍。已經努力確保關於所使用的數字(例如量、溫度等)的準確性，但應考慮一些實驗誤差和偏差。

實例1：純化對rhASM比活性的影響

【0200】 在過程表徵研究期間，我們做出了努力以便更好地瞭解影響

rhASM比活性的因素。此類過程表徵研究的目的是瞭解製造過程如何影響rhASM產物的比活性，並且找到足以控制產物比活性的關鍵步驟。

【0201】在生物反應器中產生的ASM群體中存在幾種不同的rhASM同功型。rhASM同功型的詳細資訊描述於表1中。研究表明，與rhASM的單體形式相比，rhASM的二聚化形式具有較高的比活性(圖3)。同樣，在C端半胱胺酸(C570)處具有化學修飾的奧利普酶 α 的同功型比未經修飾的形式具有較高的比活性，這可能是由於C570與活性位點之間的關聯。研究進一步證明了C末端修飾形式的豐度與增加的比活性之間的相關性(圖4)。本質上，如果組合物中存在較高豐度的經修飾的rhASM，則所述組合物將具有較高的比活性。

【0202】使包含rhASM的樣品經受陽離子交換(CEX)層析。rhASM與樹脂結合，與此同時雜質流過。載入後洗滌實現了進一步雜質減少，然後通過增加鹽濃度(與洗滌緩衝液的鹽濃度相比)將奧利普酶 α 從柱中溶析出。

【0203】通過固定化金屬親和層析(IMAC)進一步純化陽離子交換(CEX)層析溶析液。所述樹脂中裝載有金屬離子。將陽離子交換(CEX)層析溶析液調節至目標pH並且載入到平衡的IMAC柱中。然後將rhASM用高鹽溶析緩衝液溶析。

【0204】將固定化金屬親和層析(IMAC)溶析液收集、混合並且濃縮。然後如實例2中所述配製獲得的主體樣品。

【0205】觀察到在CEX層析和/或IMAC步驟中很好地控制了rhASM製劑的純度(如通過RP-HPLC測量)。如圖5所示，在CEX層析步驟中，在較高的pH、較高的鹽濃度下實現了較大的HCP清除率，但是較大的HCP清除率導致較低的回收產率。類似地，如圖6所示，在IMAC步驟中，在較低的pH、較高的鹽濃度下實現了較大的HCP清除率，但是較大的HCP清除率也導致較低的產率。通過A280

吸光度和活性水平二者測量回收率。通過Octet®測定和ELISA測量HCP水平。

【0206】出乎意料地是，導致優異的HCP清除率的條件對比活性有不利影響。如圖7所示，在CEX層析步驟中，儘管在較高的pH、較高的鹽條件下獲得較大的HCP清除率，但是獲得的rhASM製劑具有較低的比活性。類似地，如圖8所示，在IMAC步驟中，儘管在較低的pH、較高的鹽條件下獲得了較大的HCP清除率，但是獲得的rhASM製劑具有較低的比活性。

【0207】諸位發明人假設，高活性rhASM同功型與層析柱的結合較弱，並且在層析步驟的洗滌步驟中丟失。

【0208】為了檢驗這一假設，在CEX層析步驟中，分析了載入材料(例如，產物池 - CEX層析步驟之前的rhASM樣品)、在CEX層析步驟中獲得的洗滌級分以及在CEX層析步驟中獲得的溶析級分以測定它們在體外的比活性，如實例4所述。實際上，與初始載入材料和溶析級分相比，從CEX操作收集的洗滌級分展現出較大的比活性(圖9，在指定的洗滌條件下)。還測試了幾種其他鹽濃度/pH洗滌條件，其導致了相似的結果。

【0209】在IMAC步驟中，也分析了載入材料(例如，產物池 - IMAC層析步驟之前的rhASM樣品)、在IMAC層析步驟中獲得的洗滌級分以及在IMAC層析步驟中獲得的溶析級分以測定它們在體外的比活性。類似地，與初始載入材料和溶析級分相比，從IMAC操作收集的洗滌級分展現出較大的比活性(圖10A，在指定的洗滌條件下)。圖10B顯示IMAC操作進一步改善了溶析級分中rhASM的純度。實現了超過98%或99%的純度。還測試了幾種其他鹽濃度/pH條件，其導致相似的結果。

【0210】為了進一步驗證，將CEX操作和IMAC操作的載入材料、洗滌級

分和溶析級分提交用於質譜法分析，以定量未經修飾的同功型和經修飾的同功型。在分析ASM同功型後代之前，標記rhASM的游離半胱胺酸殘基。未經修飾的同功型和經修飾的同功型的相對豐度描繪於圖11(CEX操作)和圖12(IMAC操作)中。實際上，在兩種操作中均在洗滌級分中富集了具有C末端修飾的rhASM同功型。

【0211】 還觀察到，通過CEX操作，未經修飾的rhASM同功型和經修飾的rhASM同功型的相對豐度在洗滌級分和溶析級分兩者中均發生了變化。LC-MS分析表明，與載入材料相比，未經修飾的rhASM同功型的相對豐度在溶析級分中富集。與載入材料相比，經修飾的rhASM同功型總計在溶析群體中較低。因此，CEX操作能夠調節rhASM產物中未經修飾的rhASM同功型與經修飾的rhASM同功型之間的比率。

【0212】 總之，在奧利普酶 α 的製造過程中的兩個結合和溶析層析步驟的優化對比活性和rhASM同功型群體產生出乎意料的影響。觀察到兩種操作的比活性均降低，並且在兩種操作的洗滌級分中均觀察到高比活性。質譜法鑒定出弱結合的“有活性的”rhASM同功型，其在洗滌級分中富集，而在溶析級分中減少。兩項研究的分析結果均表明，通過在洗滌步驟中選擇性去除高活性的C末端修飾種類，可以降低CEX操作或IMAC操作溶析液中的比活性。此外，所述操作可以調節rhASM製劑中未經修飾的rhASM同功型與經修飾的rhASM同功型之間的比率，從而改善最終產物中rhASM群體的均勻性。如本文所述的方法允許在製造過程期間調節比活性和未經修飾的rhASM同功型和經修飾的rhASM同功型的比率，從而獲得具有所需比活性的rhASM製劑。

實例2：重組人酸性鞘磷脂酶配製品

【0213】 進行配製步驟以實現在原料藥中最終的奧利普酶 α 和賦形劑濃度。

【0214】 根據通過引用其整體併入本文的WO 2019/227029 A1中所述的方法進行配製。將從實例1中的純化過程獲得的rhASM製劑過濾以去除病毒污染物，並且在配製前濃縮以增加蛋白質濃度。將配製的主體混合，並且通過測量在280 nm處的吸光度測定rhASM濃度。然後將產物池進一步稀釋到目標體積，以獲得最終的原料藥奧利普酶 α 濃度。

【0215】 任選地，可以噴霧乾燥本文獲得的液體組合物。噴霧乾燥組合物適合於長期儲存。可以根據本領域已知的方法進行噴霧乾燥。例如，可以迫使液體組合物通過霧化器或噴嘴，以將其作為受控尺寸的小液滴分散到室內的熱氣流中，從而使液體組合物快速乾燥成粉末。然後可以將乾燥的粉末收集在乾燥室的底部。也考慮了用於製備粉末狀組合物的其他乾燥方法。

實例3：奧利普酶 α 在患有酸性鞘磷脂酶缺乏症的患者中的功效、安全性、藥效學和藥動學研究

【0216】 在臨床研究中使用實例2中製備的重組人奧利普酶 α 配製品以評價其功效。研究設計示於圖13中。基線患者和疾病特徵在表6中提供。

表6. 基線患者和疾病特徵

參數	安慰劑 (N=18)	奧利普酶 α (N=18)
以歲計的基線時平均年齡(範圍)	33.5(18.6-65.9)	36.2(18.8-59.9)
以歲計的確診時平均年齡 $\pm$ SD	14.6 $\pm$ 16.1	21.4 $\pm$ 20.3
性別，男性/女性，n(%)	5(28%)/13(72%)	9(50%)/9(50%)
針對血紅蛋白調整的平均預測DLco% $\pm$ SD	48.5 $\pm$ 10.8	49.4 $\pm$ 11.0
以MN計的平均脾體積 $\pm$ SD	11.21 $\pm$ 3.84	11.70 $\pm$ 4.92
平均脾腫大相關得分(SRS) $\pm$ SD	28.05 $\pm$ 10.6	24.55 $\pm$ 11.1
以MN計的平均肝體積 $\pm$ SD	1.62 $\pm$ 0.50	1.44 $\pm$ 0.32

平均血小板計數 x 10 ⁹ /L ± SD	115.6 ± 36.3	107.2 ± 26.9
-----------------------------------	--------------	--------------

DL_{co} = 一氧化碳的彌散量；MN = 正常值的倍數；SD = 標準差；SRS = 脾腫大相關得分

【0217】 這項研究的主要目的是通過評估以下方面的變化來評價每2週靜脈內投予一次配製品持續52週在患有酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD)的成年患者中的功效：1) 如通過腹部磁共振成像(MRI)測量的脾體積(以及僅對於美國 [US] 而言，與如通過脾腫大相關得分 [SRS] 測量的患者對脾體積的有關感知聯合)；以及2) 浸潤性肺疾病，如通過肺功能測試測量的肺的一氧化碳彌散量(DLCO)。

主要終點 - 預測DLCO%的變化百分比

【0218】 如圖14所示的結果表明，在基線時，兩組的平均預測DL_{co}%相似並且反映了中度疾病；從基線至第52週，奧利普酶α組的平均改善為22%，相比之下，安慰劑組的平均改善為3%；在第52週組間的差異為19%(p < 0.0004)，並且最早在第26週觀察到改善；這項研究被宣佈為積極的；並且在第52週，奧利普酶α組中的平均預測FVC%也得到改善，但在安慰劑組中並非如此。

【0219】 肺部成像研究也顯示出了ASMD介導的間質性肺疾病的改善。來自奧利普酶α治療的患者的說明性高解析度電腦斷層圖像(圖15)顯示了由鞘髓磷脂填充的巨噬細胞引起的“毛玻璃”陰影的清除。在奧利普酶α治療的患者中，雙肺中的HRCT毛玻璃外觀得分和間質性肺疾病得分顯示出平均改善，而在安慰劑治療的患者中並非如此(圖16)。

主要終點 - 脾反應

【0220】 在所有用奧利普酶α治療的患者中脾體積減小，而在安慰劑治療的患者中並非如此(圖17，左圖)。安慰劑組中的平均基線脾體積為11.2 MN(正常值的倍數)，而奧利普酶組中的平均脾體積為11.7 MN，這表示中度脾腫大。在奧

利普酶 α 治療的患者中，截至治療6個月時觀察到脾體積明顯減小，並且在具有最嚴重的基線脾腫大的患者中觀察到最大程度的減小。在第52週時，在奧利普酶 α 治療的患者中顯示出脾大小的統計學上顯著的39%減小，相比之下，在安慰劑患者中顯示出0.5%增加($p < 0.0001$)。此外，在18名奧利普酶 α 治療的患者中有17名(94%)脾臟體積減小 $\geq 30\%$ ，相比之下，0/18名安慰劑患者脾臟體積減小 $\geq 30\%$ 。在基線時脾最大的奧利普酶 α 治療的患者中觀察到最大的減小。

【0221】還計算了奧利普酶 α 治療的患者和安慰劑治療的患者的脾腫大相關得分，其在兩組中均平行下降(圖17，右圖)。在SRS與基線或最終脾體積之間沒有相關性；因此，通過SRS測量的症狀不能反映生理疾病負擔。安慰劑組的平均基線SRS得分為28.1，並且奧利普酶 α 組的平均基線SRS得分為24.6。兩組均顯示SRS得分降低；然而，在多重調整後，與安慰劑組(-9.28)相比，奧利普酶 α 組(-7.66)從基線至第52週的SRS得分的LS平均變化無統計學差異； $p = 0.6364$ 。值得注意的是，SRS改編自根據骨髓纖維化試驗，並且以前在ASMD患者中沒有得到驗證。

次要終點 - 肝反應

【0222】患者患有中度基線肝腫大，其中安慰劑組中的平均肝體積為1.6 MN，並且奧利普酶 α 組中的平均肝體積為1.4 MN，此外還具有致動脈粥樣硬化脂質檢查結果和異常肝功能測試結果。

【0223】從基線至第52週的肝體積的LS平均變化百分比表明，與安慰劑組(1.42%，名義 $p < 0.0001$)相比，奧利普酶 α 組(31.67%)的降低更大。(圖18)。類似地，在奧利普酶 α 治療的患者中，基線致動脈粥樣硬化脂質檢查結果得到改善，而在安慰劑的患者中並非如此，其中LDL膽固醇和甘油三酯平均降低且HDL膽

固醇增加。在奧利普酶 α 治療的患者中，平均ALT和AST以及其他肝功能測試也得到改善，而在安慰劑治療的患者中並非如此。

次要終點 - 血小板計數

【0224】在奧利普酶 α 治療的患者中，平均血小板計數得到改善，而在安慰劑治療的患者中並非如此(分別為+16.8%相比於+2.5%， $p = 0.019$)，其中截至第26週觀察到臨床差異。

探索性終點 - 肝鞘磷脂

【0225】監測奧利普酶 α 治療的患者和安慰劑治療的患者中的肝鞘磷脂水平。在奧利普酶 α 治療的患者中，在52週後鞘磷脂佔據的平均組織面積百分比從29%降至2%，但是在安慰劑患者中沒有變化(圖19)。如代表性肝活檢物圖像所示，肝活檢物的組織學分析資料顯示，在奧利普酶 α 治療的患者中，庫普弗細胞和肝細胞中的鞘磷脂被大量清除，而在安慰劑治療的患者中並非如此(圖20)。

探索性終點 - 生物標記物反應

【0226】在基線時，血漿生物標記物殼三糖苷酶和溶血鞘磷脂兩者的平均水平均顯著升高。兩組的基線值為：殼三糖苷酶的基線值 $> 14x$ ULN，溶血鞘磷脂的基線值 $> 38x$ ULN。在第52週，奧利普酶 α 組中的平均殼三糖苷酶水平降低54%，相比之下，安慰劑組中的平均殼三糖苷酶水平降低12%。在第52週，奧利普酶 α 組中的平均溶血鞘磷脂降低78%，相比之下，安慰劑組中的平均溶血鞘磷脂降低6%。在奧利普酶 α 治療的患者中，從治療的第一週開始兩者均顯示出明顯減少，而在安慰劑治療的患者中並非如此(圖21)。

總結

【0227】總體安全性和耐受性概況良好，並且本試驗未發現新的安全性風

險。沒有患者死亡，也沒有因不良事件而永久停用奧利普酶 α 。除一名患者因依從性差而在初步分析期期間停藥外，所有患者均繼續進行試驗擴展。3名奧利普酶 α 治療的患者具有5例嚴重不良事件，並且4名安慰劑患者具有11例嚴重不良事件，但是這些嚴重不良事件均被認為與治療不相關。在開始酶替代療法的患者中所預期的與輸注相關的反應是輕度或中度的，並且是易於控制的。在18名奧利普酶 α 治療的患者中有4名產生了治療誘導的抗藥物抗體；這些患者中有2名具有暫態抗體，並且其餘2名患者具有持續但低的抗體滴度。沒有患者產生干擾細胞攝取酶的中和抗體。

【0228】 這項研究被宣佈為正面的，因為它達到了DL_{co}終點，並且總體資料證明了臨床益處。在用通過如本文所述方法產生的rhASM治療的患者中，ASMD相關間質性肺疾病得到改善。脾體積減小伴隨血小板計數增加，反映了脾功能亢進的糾正。肝體積因鞘磷脂的清除而減小，這是由一系列肝活檢物的組織學證據支持的。代謝功能得到改善，如由肝功能測試結果和脂質檢查結果的改善證明的。通過SRS測量的症狀未反映如通過生理衡量指標(脾體積)測量的疾病負擔。基於這項研究，患有ASMD的成人中奧利普酶 α 的益處-風險特徵是有利的。

【0229】 該臨床研究表明，通過如本揭露所述的方法製備的rhASM組合物在治療ASMD患者方面顯示出優異的安全性和功效。

實例4：rhASM比活性體外活性測定

【0230】 本實例描述了一種基於合成基質2-(N-十六醯基胺基)-4-硝基苯基磷醯膽鹼(HDA-PC)的水解測定樣品中重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)的活性(以U/mL計)和比活性(以U/mg計)的方法。如下測量由rhASM催化的合成基質的水解

的速率。

【0231】 將大約1 $\mu\text{g/mL}$ rhASM與1 mM 2-(N-十六醯基胺基)-4-硝基苯基磷醯膽鹼在50 mM乙酸鈉、0.1 mM乙酸鋅、和0.25 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)(pH 5.3)中在37.0°C的循環水浴中培育15分鐘。基本上，將80 μL 基質添加到20 μL 酶中以開始反應。通過添加300 μL 0.1 M甘胺酸、0.1 M NaOH、50%乙醇溶液停止反應，並且在415 nm處測量釋放的2-(N-十六醯基胺基)-4-硝基苯酚(HDA-NP)產物的吸光度。一個活性單位被定義為在限定的測定條件下將1 μmol 2-(N-十六醯基胺基)-4-硝基苯基磷醯膽鹼(HDA-PC)水解為2-(N-十六醯基胺基)-4-硝基苯酚(HDA-NP)每分鐘所需的酶的量。通過將酶活性結果(以U/mL計)除以相應的rhASM蛋白濃度(以mg/mL計)來計算比活性(以U/mg計)。

等同方案和範圍

【0232】 熟習此項技術者僅使用常規實驗就將認識到或能夠確定本文描述的實施例的許多等同方案。本揭露的範圍並不旨在受限於上述說明，而是如所附的申請專利範圍中所述。

【0233】 除非上下文明確指示相反或其他含義，否則諸如“一個/一種(a)”、“一個/一種(an)”和“所述”的冠詞可以意指至少一個/一種。除非上下文明確指示相反或其他含義，否則在一組的兩個或更多個成員之間包含“或”的請求項或說明書被視為滿足如下條件：存在一個、多於一個或全部組成員。在兩個或更多個組成員之間包含“或”的組的公開文本提供了其中恰好存在所述組的一個成員的實施例、其中存在所述組的多於一個成員的實施例以及其中存在全部組成員的實施例。出於簡潔的目的，那些實施例沒有在本文中單獨闡述，但是應當理解，這些實施例中的每一個都提供於本文中並且可以被特別地要求保護或拒絕保

護。

【0234】 應當理解，本揭露涵蓋所有變化、組合和排列，其中來自至少一個請求項或來自說明書的至少一個相關部分的至少一個限制、元素、條款或描述性術語被引入另一個請求項中。例如，可以修改從屬於另一請求項的請求項，以包括在從屬於相同基礎請求項的任何其他請求項中發現的至少一個限制。此外，當請求項引用組合物時，應理解，除非一般熟習此項技術者清楚將出現矛盾或不一致，否則根據本文所公開的任何製備或使用或根據本領域已知的方法(如果有的話)製備或使用所述組合物的方法被包括在內。

【0235】 在要件以清單形式(例如，以馬庫什組形式)呈現的情況下，應當理解，還公開了元素的每個可能的亞組，並且可以從所述組去除任何元素或元素亞組。還應注意，術語“包含”旨在是開放式的並且允許包括其他元素或步驟。應當理解，一般而言，當實施例、產物或方法被稱為包括特定元素、特徵或步驟時，也提供了由此類元素、特徵或步驟組成或基本上由其組成的實施例、產物或方法。出於簡潔的目的，那些實施例沒有在本文中單獨闡述，但是應當理解，這些實施例中的每一個都提供於本文中並且可以被特別地要求保護或拒絕保護。

【0236】 在申請專利範圍中以及在上述說明書中，所有過渡性短語如“包含”、“包括”、“攜帶”、“具有”、“含有”，“涉及”、“持有”和“由.....構成”應當理解為是開放性的，即意指包括但不限於。如美國專利局的專利審查程式手冊第2111.03節中所示，只有過渡性短語“由.....組成”和“基本上由.....組成”應分別為封閉或半封閉過渡性短語。

【0237】 在給出範圍時，端點被包括在內。此外，應理解，除非根據上下

文和/或一般熟習此項技術者的理解另有說明或有其他明確含義，否則在同一實施例中，表示為範圍的值可以假定所述範圍內的任何具體值，除非上下文明確另有規定，否則精確至所述範圍的下限的單位的十分之一。出於簡潔的目的，每個範圍內的值在本文中並未單獨闡述，但應理解這些值中的每一個都提供於本文中並且可以被特別地要求保護或拒絕保護。還應理解，除非根據上下文和/或一般熟習此項技術者的理解另有說明或有其他明確含義，否則表示為範圍的值可以假定給定範圍內的任何子範圍，其中所述子範圍的端點是以如下相同的精度表示：所述範圍的下限的單位的十分之一。

【0238】 在提供網站的情況下，URL位址以非流覽器可執行代碼的形式提供，且括弧中是相應網址的週期(period)。實際網址不包括弧。

【0239】 另外，應當理解，本揭露的任何特定實施例可以明確地從任何至少一項請求項中排除。在給出範圍的情況下，所述範圍內的任何值可以明確地從任何至少一項請求項中排除。本揭露的組合物和/或方法的任何實施例、元素、特徵、應用或態樣可以從任何至少一項請求項中排除。出於簡潔的目的，本文未明確闡述排除了至少一個元素、特徵、目的或態樣的所有實施例。

【0240】 將本文中(例如，在背景技術、發明內容、具體實施方式、實例和/或參考文獻部分中)提及的所有出版物、專利、專利申請、出版物和資料庫條目(例如，序列資料庫條目)均通過引用以其整體特此併入，就好像每個單獨的出版物、專利、專利申請、出版物和資料庫條目通過引用被具體且分別地併入本文。在衝突的情況下，以包括本文的任何定義在內的本申請為準。

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="112071-seq.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-06-
16">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112109733</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-03-16</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>US 63/321,636</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-03-18</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商健臻公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>GENZYME CORPORATION</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">重組人類酸性鞘磷脂酶醫藥組合物及方法
</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>20</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>627</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..627</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Synthetic: amino acid sequence of olipudase alfa,
including its leader sequence</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>合成：olipudase alfa的胺基酸序列，包括其前導序
列</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
      </INSDSeq>
    </SequenceData>
  </ST26SequenceListing>

```

```
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..627</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MARYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLALALALALALSDSRVLWAPAEAHPLSP
QGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVE
VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADP
LCCRRGSGLPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDI PAHDVWHQTRQDQLRALTTVTALVR
KFLGPVPVYPAVGNHES TPVNSFP PPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRTLRI GGFYALSPYPGLRLISLNMNF
CSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFE
VFYDEETLSRPLAFLAPSATTYIGLNPgyrvyQIDGNYSGSSHVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYG
LPNTLPTAWHNLVYMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWP
RPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>570</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier id="q3">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Synthetic: mature olipudase alfa sequence, without
leader sequence</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成：成熟olipudase alfa序列，不含前導序列
</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q4">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTA INLGLKKEPNVARVGSVAIKLCN
LLKIAPPAVCQSI VHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRI
LFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSLPPASRPAGYWGYESKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDVMVYWTGDIPA
HDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPFPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRTL
RIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYR
IVARYENTLAAQFFGHTHVDEFVYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNPgyrvyQIDGNYSgsshvVLDHETYILNL
TQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYRMGRDMLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARA
DSPALCRHLM PDGSLPEAQLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>629</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_mol type>AA</INSDSeq_mol type>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..629</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q5">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic: human ASM</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成：人ASM</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..629</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MPRYGASLRQSCPRSGREQGDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALS DSRVLWAPAEAHPL
SPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTA INLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKIAPPAVCQSI VHLFEDDM
VEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPKPPSPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCA
DPLCCRRGSGLPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDI PAHDVWHQTRQDQLRALTTVTAL
VRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPIEIGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRTLRI GGFYALSPYPGLRLISLNM
NFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGH THVDE
FEVFYDEETLSRPLAFAFLAPSATTYIGLNPGRVYQIDGNYSRSSHVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARET
YGLPNTLPTAWHNLVYMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLM PDGSLPEAQSL
WPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>570</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: human ASM mature protein, without leader
sequence</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：人ASM成熟蛋白，不含前導序列
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCN
LLK IAPPAVCQSI VHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNI SLPTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRI
LFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSLPPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTL ESLLSGLGPAGPFDVMVYWTGDI PA
HDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRTL
```

```
RIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCsRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYR
IVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSRSSHVLDHETYILNL
TQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARA
DSPALCRHLMPDGSLPEAQLSWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>629</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..629</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q9">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: human ASM</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：人ASM</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..629</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALSDSRVLWAPAEAHPL
SPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDM
VEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCA
DPLCCRRGSGLPASRPGAGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVTAL
VRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPALRTRLRIGGFYALSPYPGLRLISLNM
NFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDE
FEVFYDEETLSRPLAFLAPSATTYIGLNPGRVYQIDGNYSGSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARET
YGLPNTLPTAWHNLVYMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLMPDGSLPEAQSL
WPRPLFC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>570</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: human ASM mature protein, without leader
sequence</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：人ASM成熟蛋白，不含前導序列
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..570</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q12">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTA INLGLKKEPNVARVGSVAIKLCN
LLKIAPPAVCQSI VHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRI
LFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPASRPGAGYWGYESKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPA
HDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHSTPVNSFPPPIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRTL
RIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFWLLINSTDPAGQLQWL VGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNYR
IVARYENTLAAQFFGHTHVDEFVYDEETLSRPLAVAF LAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVLDHETYILNL
TQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARA
DSPALCRHLM PDGSLPEAQLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: rhASM isoform</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：rhASM同功型</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql4">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLPDGSLEAQLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql5">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: rhASM isoform with S-
glutathionylation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有S-麩胱甘肽化的rhASM同功型
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature_key>MOD_RES</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="ql6">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>S-glutathionylation</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>S-麩胱甘肽化</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="ql7">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLPDGSLEPAQSLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="ql8">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: rhASM isoform with
cysteinylation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有半胱胺醯化的rhASM同功型
</NonEnglishQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MOD_RES</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>28</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q19">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>cysteinylation</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>半胱胺醯化</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLMPDGSLPEAQLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q21">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminal Truncation form
1</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成：C-末端截短形式
1</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLMPDGSLEAQLWPRPLF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q23">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminal Truncation form
2</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成：C-末端截短形式
2</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLM PDGSLPEA QSLWPRPL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
```

```

<INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q25">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminal Truncation form
3</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成：C-末端截短形式
3</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q26">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLPDGSLEAQLWPRP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>

```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q27">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with S-
glutathionylation</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成：具有S-麩胱甘肽化的rhASM的C-末端胺基酸
</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MOD_RES</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q28">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>S-glutathionylation</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>S-麩胱甘肽化</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q29">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGS LPEA QSLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with
cysteinylation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有半胱胺醯化的rhASM的C-末端胺基酸
</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>MOD_RES</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q31">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>cysteinylation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>半胱胺醯化</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q32">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGSLEPAQSLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q33">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with C-
terminal Truncation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有C-末端截短的rhASM的C-末端胺基酸
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q34">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGS LPEA QSLWPRPLF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q35">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with C-
terminal Truncation</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成：具有C-末端截短的rhASM的C-末端胺基酸
</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q36">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGSLEPAQSLWPRPL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q37">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with C-
terminal Truncation</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有C-末端截短的rhASM的C-末端胺基酸
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q38">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>

```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGSLEPAQSLWPRP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q39">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM with MMTS
labeling</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有MMTS標記的rhASM的C-末端胺基酸
          </NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>MOD_RES</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier id="q40">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>MMTS labeling</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>MMTS標記</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDFeature>

```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q41">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGSLPEAQSLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM having C-terminus dimerization</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有C-末端二聚化的rhASM的C-末端胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q43">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGSLEPAQSLWPRPLFC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic: C-terminus amino acid of rhASM having C-terminus dimerization</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成：具有C-末端二聚化的rhASM的C-末端胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>  
  <INSDQualifier>  
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>  
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>  
  </INSDQualifier>  
  <INSDQualifier id="q45">  
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>  
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>  
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>  
  </INSDQualifier>  
</INSDFeature_qual>  
</INSDFeature>  
</INSDSeq_feature-table>  
<INSDSeq_sequence>DSPALCRHLM</INSDSeq_sequence>  
</INSDSeq>  
</SequenceData>  
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種純化重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的方法，其包括以下步驟：

(i) 使包含rASM和宿主細胞蛋白(HCP)的蛋白質混合物經受陽離子交換(CEX)層析，或者

使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，或者

使包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受CEX層析和IMAC兩者；以及

(ii) 收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【請求項2】 如請求項1所述的方法，其中使所述蛋白質混合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC。

【請求項3】 如請求項1所述的方法，其中使所述蛋白質混合物串聯地經受IMAC和CEX層析，並且使從所述IMAC獲得的溶析液經受所述CEX層析。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項所述的方法，其中使所述蛋白質混合物分別地經受所述CEX層析和所述IMAC兩者，其中在兩者之間具有一個或多個另外的步驟。

【請求項5】 如請求項3所述的方法，其中在使所述包含rASM和HCP的蛋白質混合物經受所述CEX層析或所述IMAC之前或之後，使所述混合物經受一個或多個另外的純化柱。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述的方法，其進一步包括滅活和/或去除潛在的病毒污染物的步驟。

【請求項7】 如請求項1至6中任一項所述的方法，其進一步包括濃縮所述純化的rASM的步驟。

【請求項8】 如請求項1至7中任一項所述的方法，其中所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項所述的方法，其中所述蛋白質混合物係從表現所述rASM的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞獲得。

【請求項10】 如請求項1至9中任一項所述的方法，其中所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【請求項11】 如請求項1至10中任一項所述的方法，其中所述陽離子交換(CEX)層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【請求項12】 如請求項1至11中任一項所述的方法，其中所述IMAC是螯合樹脂。

【請求項13】 如請求項12所述的方法，其中所述IMAC是用鋅、銅、或鎳進行的。

【請求項14】 如請求項1至13中任一項所述的方法，其中所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項15】 如請求項14所述的方法，其中所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後與所述CEX層析柱結合的rASM。

【請求項16】 如請求項1至15中任一項所述的方法，其中所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項17】 如請求項16所述的方法，其中所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後與所述IMAC柱結合的rASM。

【請求項18】 如請求項1至17中任一項所述的方法，其中所述純化的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。

【請求項19】 如請求項18所述的方法，其中所述純化的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。

【請求項20】 如請求項18所述的方法，其中所述純化的rASM製劑的比活性為約10-20 U/mg。

【請求項21】 如請求項1至20中任一項所述的方法，其中所述純化的rASM製劑的HCP水平不超過1.0 µg/mg。

【請求項22】 如請求項1至21中任一項所述的方法，其中所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【請求項23】 如請求項22所述的方法，其中所述具有修飾的rASM同功型包含選自C末端半胱胺醯化、S-羧基甘氨酸化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾。

【請求項24】 如請求項1至23中任一項所述的方法，其中在生產規模為至少100 L的生物反應器中生產所述蛋白質混合物。

【請求項25】 如請求項24所述的方法，其中在生產規模為至少500 L的生物反應器中生產所述蛋白質混合物。

【請求項26】 一種調節初始rASM組合物中重組酸性鞘磷脂酶(rASM)的同功型的相對量的方法，其中所述初始rASM組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型，其中所述方法包括

(i) 使所述初始rASM組合物經受陽離子交換(CEX)層析，或者使所述初始rASM組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，或者使所述初始rASM組合物經受CEX層析和IMAC兩者；以及

(ii) 收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【請求項27】 如請求項26所述的方法，其中使所述初始rASM組合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC。

【請求項28】 如請求項26所述的方法，其中使所述初始rASM組合物串聯地經受IMAC和CEX層析，並且使從所述IMAC獲得的溶析液經受所述CEX。

【請求項29】 如請求項26所述的方法，其中使所述初始rASM組合物分別地經受所述CEX層析和所述IMAC兩者，其中在兩者之間具有一個或多個另外的步驟。

【請求項30】 如請求項26至29中任一項所述的方法，其中所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。

【請求項31】 如請求項26至30中任一項所述的方法，其中所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【請求項32】 如請求項26至31中任一項所述的方法，其中所述陽離子交換層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【請求項33】 如請求項26至32中任一項所述的方法，其中所述IMAC是螯合樹脂柱。

【請求項34】 如請求項33所述的方法，其中所述IMAC是用鋅、銅或鎳進行的。

【請求項35】 如請求項26至34中任一項所述的方法，其中所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項36】 如請求項35所述的方法，其中所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後所述CEX層析柱上所結合的所有種類。

【請求項37】 如請求項26至34中任一項所述的方法，其中所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項38】 如請求項37所述的方法，其中所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後所述IMAC柱上所結合的所有種類。

【請求項39】 如請求項26至38中任一項所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。

【請求項40】 如請求項39所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。

【請求項41】 如請求項39所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg。

【請求項42】 如請求項26至41中任一項所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過1.0 µg/mg。

【請求項43】 如請求項26至42中任一項所述的方法，其中所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【請求項44】 如請求項26至43中任一項所述的方法，其中所述修飾選自C末端半胱胺醯化、S-羧基甘氨酸化、二聚化、和截短組成之群組。

【請求項45】 如請求項26至44中任一項所述的方法，其中在生產規模為至少100 L或至少500 L的生物反應器中生產所述包含rASM的起始組合物。

【請求項46】 一種調節液體組合物中的重組酸性鞘磷脂酶(rASM)比活性的方法，所述液體組合物包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端

半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型，其中所述方法包括：

- (i) 使所述液體組合物經受陽離子交換(CEX)層析，或者使所述液體組合物經受固定化金屬親和層析(IMAC)，或者使所述液體組合物經受CEX層析和IMAC兩者；以及
- (ii) 收集來自所述CEX層析或所述IMAC的溶析液，從而獲得純化的rASM製劑。

【請求項47】 如請求項46所述的方法，其中使所述液體組合物串聯地經受CEX層析和IMAC，並且使從所述CEX層析獲得的溶析液經受所述IMAC，或者其中使所述液體組合物串聯地經受IMAC和CEX層析，並且使從所述IMAC獲得的溶析液經受所述CEX層析。

【請求項48】 如請求項46所述的方法，其中使所述初始rASM組合物分別地經受所述CEX層析和所述IMAC兩者，其中在兩者之間具有一個或多個另外的步驟。

【請求項49】 如請求項46至48中任一項所述的方法，其中所述rASM是重組人酸性鞘磷脂酶(rhASM)。

【請求項50】 如請求項46至49中任一項所述的方法，其中所述rASM包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【請求項51】 如請求項46至50中任一項所述的方法，其中所述陽離子交換(CEX)層析包括選自羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸酯(P)、和磺酸酯(S)組成之群組的樹脂。

【請求項52】 如請求項46至51中任一項所述的方法，其中所述IMAC是螯合樹脂柱。

【請求項53】 如請求項52所述的方法，其中所述IMAC是用鋅、銅、或鎳進行的。

【請求項54】 如請求項46至53中任一項所述的方法，其中所述CEX層析包括用具有第一最適pH和第一最適鹽濃度的CEX洗滌緩衝液洗滌CEX層析柱，其中所述第一最適pH和所述第一最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項55】 如請求項54所述的方法，其中所述CEX層析進一步包括用具有第二最適pH和第二最適鹽濃度的CEX溶析緩衝液溶析所述CEX層析柱，其中在所述第二最適pH和所述第二最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後與所述CEX層析柱結合的所有種類。

【請求項56】 如請求項46至55中任一項所述的方法，其中所述IMAC包括用至少一種具有第三最適pH和第三最適鹽濃度的IMAC洗滌緩衝液洗滌IMAC柱，其中所述第三最適pH和所述第三最適鹽濃度是根據所述樹脂和所述蛋白質混合物的起始比活性預先確定的。

【請求項57】 如請求項56所述的方法，其中所述IMAC進一步包括用具有第四最適pH和第四最適鹽濃度的IMAC溶析緩衝液溶析所述IMAC柱，其中在所述第四最適pH和所述第四最適鹽濃度下，從所述柱移取在所述洗滌步驟後與所述IMAC柱結合的所有種類。

【請求項58】 如請求項46至57中任一項所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。

【請求項59】 如請求項58所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約10至45 U/mg。

【請求項60】 如請求項58所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg，任選地所述製劑中的rASM的純度為至少98%。

【請求項61】 如請求項46至60中任一項所述的方法，其中所述獲得的rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過5.0 µg/mg。

【請求項62】 如請求項46至61中任一項所述的方法，其中所述純化的rASM製劑包含具有修飾的rASM同功型，其總共不超過整個rASM群體的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

【請求項63】 如請求項62所述的方法，其中所述修飾選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組。

【請求項64】 如請求項46至63中任一項所述的方法，其中在生產規模為至少100 L或至少500 L的生物反應器中生產所述包含rASM的液體組合物。

【請求項65】 一種重組酸性鞘磷脂酶(rASM)製劑，其包含未經修飾的rASM同功型和至少一種具有選自C末端半胱胺醯化、S-麩胱甘肽化、二聚化、和截短組成之群組的一個或多個修飾的rASM同功型種類，其中所述未經修飾的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

【請求項66】 如請求項65所述的rASM製劑，其中所述未經修飾的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多。

【請求項67】 如請求項65或請求項66所述的rASM製劑，其中所有經修飾的rASM同功型總共佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過40%。

【請求項68】 如請求項67所述的rASM製劑，其中所有經修飾的rASM同功型總共佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過40%、不超過35%、不超過30%、不超過25%、不超過20%、不超過15%、不超過14%、不超過13%、不超過12%、不超過11%、不超過10%、不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【請求項69】 如請求項65至68中任一項所述的rASM製劑，其中具有C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過10%。

【請求項70】 如請求項69所述的rASM製劑，其中所述具有C末端半胱胺醯化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過9%、不超過8%、不超過7%、不超過6%、不超過5%或更少。

【請求項71】 如請求項65至70中任一項所述的rASM製劑，其中具有C末端S-麩胱甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過5%。

【請求項72】 如請求項71所述的rASM製劑，其中所述具有C末端S-麩胱甘肽化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過5%、不超過4%、不超過3%、不超過2%、不超過1%或更少。

【請求項73】 如請求項65至72中任一項所述的rASM製劑，其中具有C末端二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過0.2%。

【請求項74】 如請求項73所述的rASM製劑，其中所述具有C末端S-二聚化的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過0.1%。

【請求項75】 如請求項65至74中任一項所述的rASM製劑，其中具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過8%。

【請求項76】 如請求項75所述的rASM製劑，其中所述具有C末端截短的rASM同功型佔所述rASM製劑中總rASM群體的不超過7%、不超過6%、不超過5%、不超過4%、不超過3%或更少。

【請求項77】 如請求項65至76中任一項所述的rASM製劑，其中所述rASM製劑的純度為至少95%。

【請求項78】 如請求項65至77中任一項所述的rASM製劑，其中所述rASM製劑的純度為至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高。

【請求項79】 如請求項65至78中任一項所述的rASM製劑，其中所述rASM製劑的比活性為約5至50 U/mg。

【請求項80】 如請求項79所述的rASM製劑，其中所述rASM製劑的比活性為約10至20 U/mg。

【請求項81】 如請求項65至80中任一項所述的rASM製劑，其中所述rASM製劑的宿主細胞蛋白(HCP)水平不超過5.0 µg/mg。

【請求項82】 如請求項65至82中任一項所述的rASM製劑，其中使用如請求項1至25中任一項所述的方法製造所述rASM製劑。

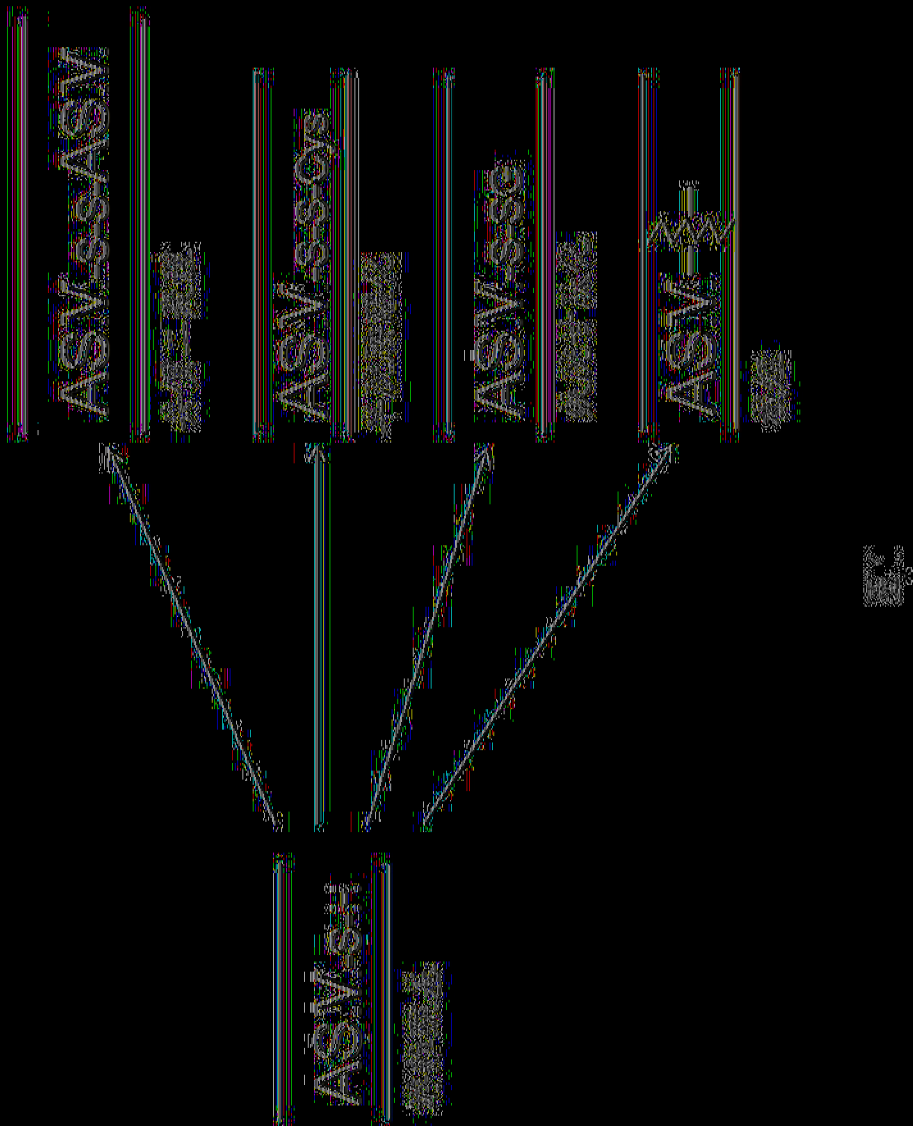
【請求項83】 一種使用如請求項65至82中任一項所述的重組酸性鞘磷脂酶(rASM)製劑製備的醫藥組合物。

【請求項84】 一種治療有需要的個體的酸性鞘磷脂酶缺乏症的方法，其包括向所述個體投予如請求項65至82中任一項所述的醫藥組合物。

【請求項85】 如請求項1至64中任一項所述的方法，其進一步包括使所述純化的rASM進行緩衝液交換的步驟。

【請求項86】 如請求項1至64中任一項所述的方法，其中所述方法是部分或完全地在 $8^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的冷藏條件下進行的。

【請求項87】 如請求項1至64中任一項所述的方法，其中所述方法是部分或完全地在環境溫度下進行的。



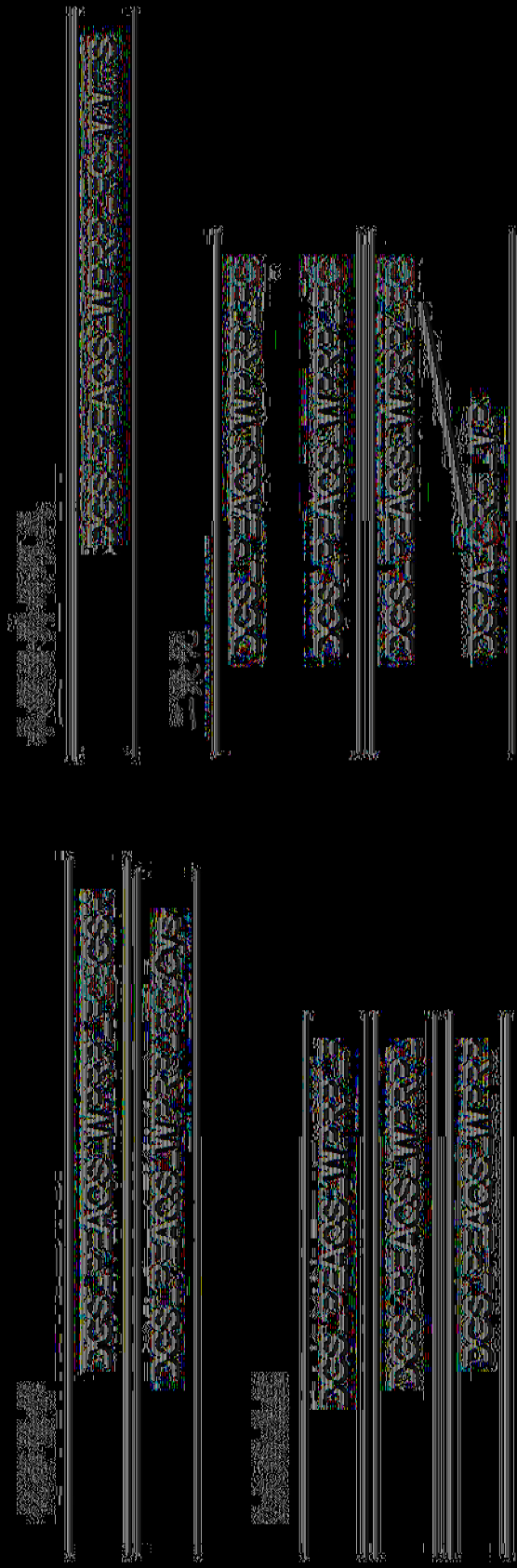
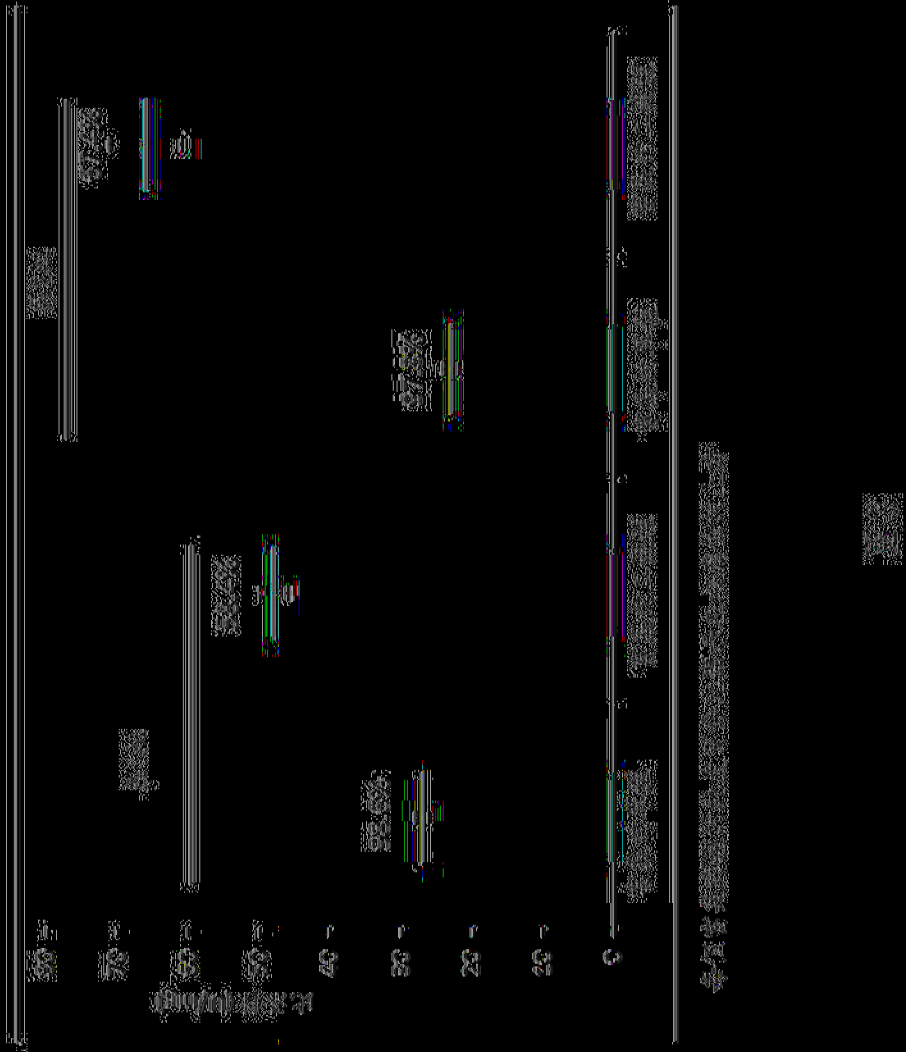
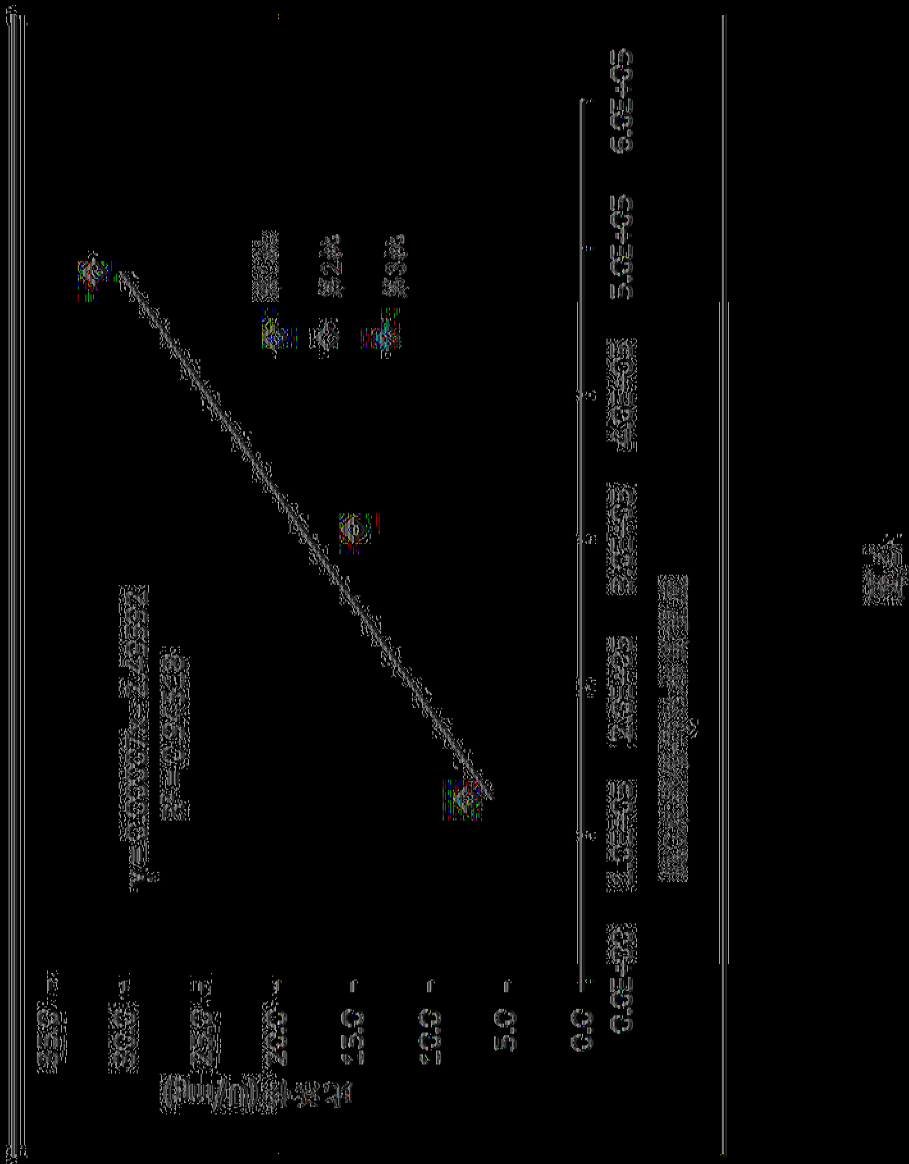
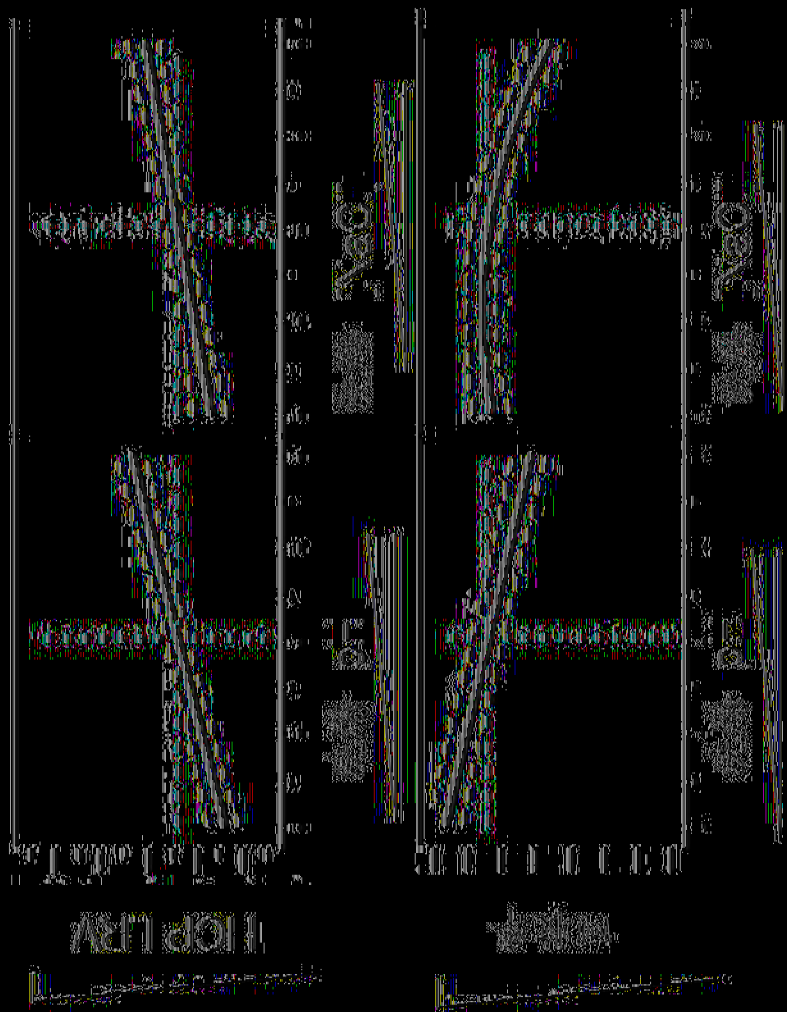


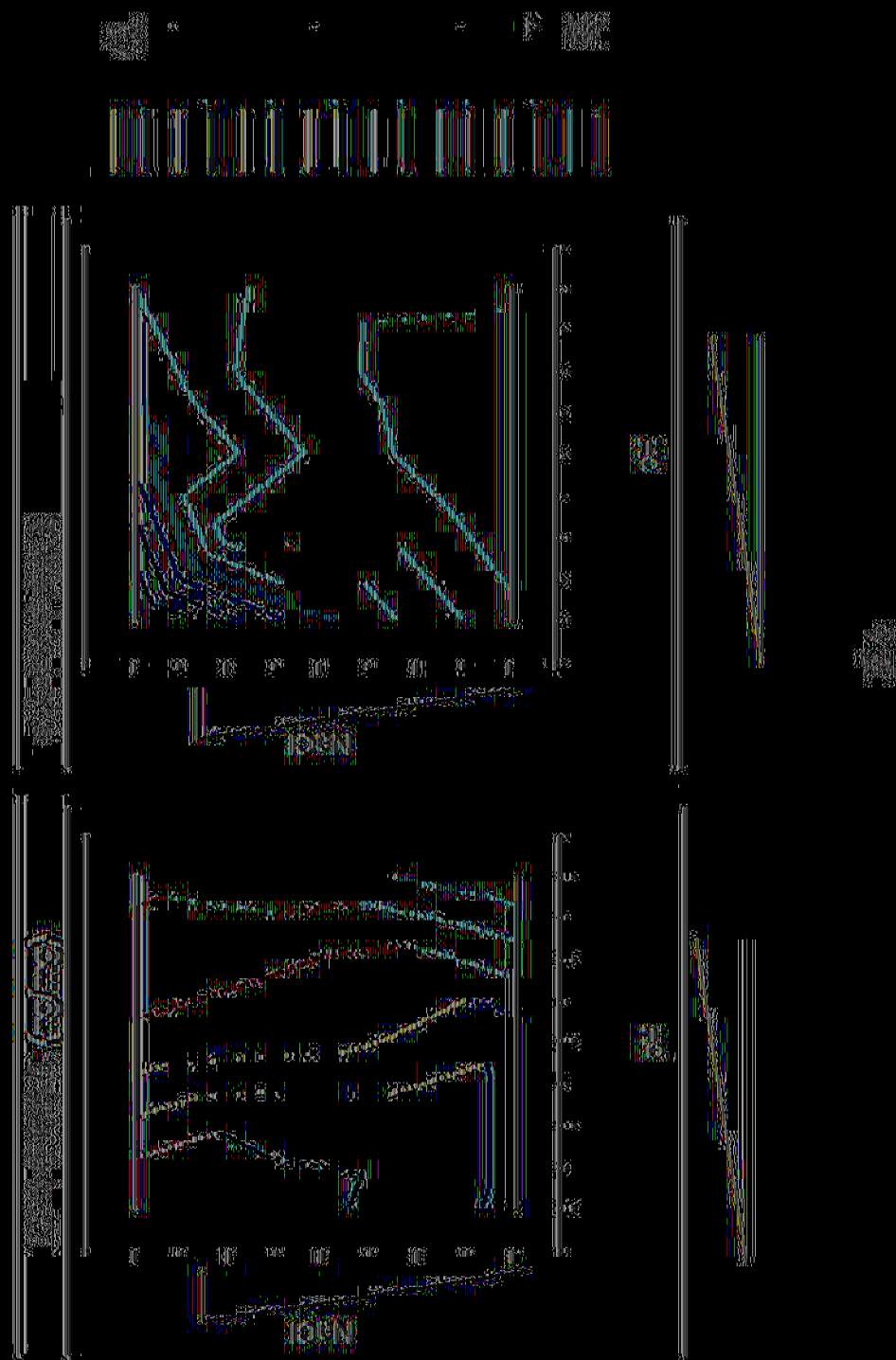
圖2

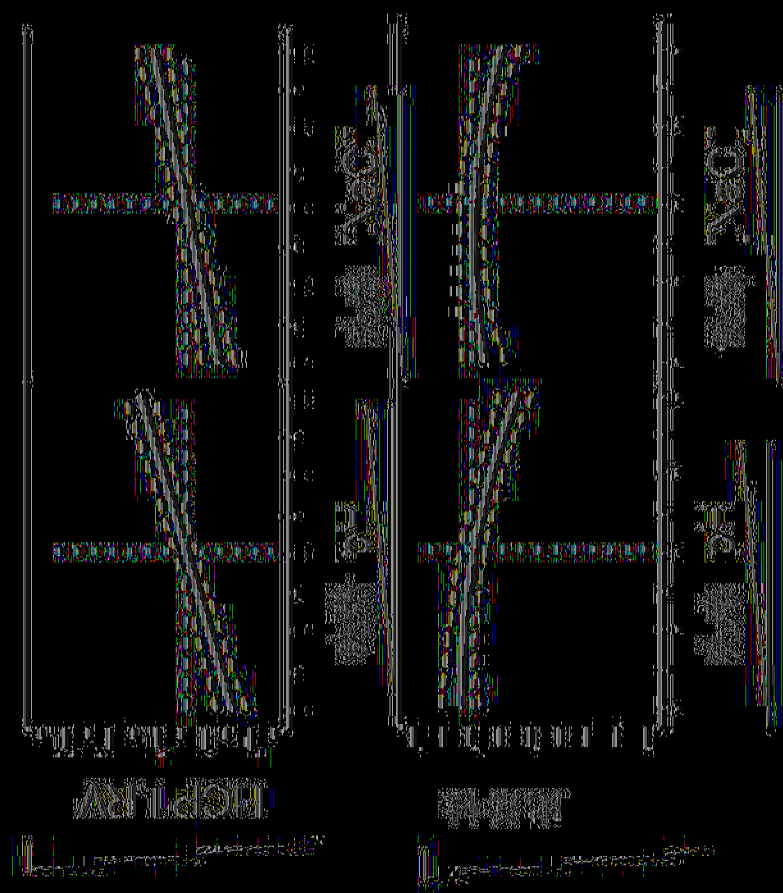


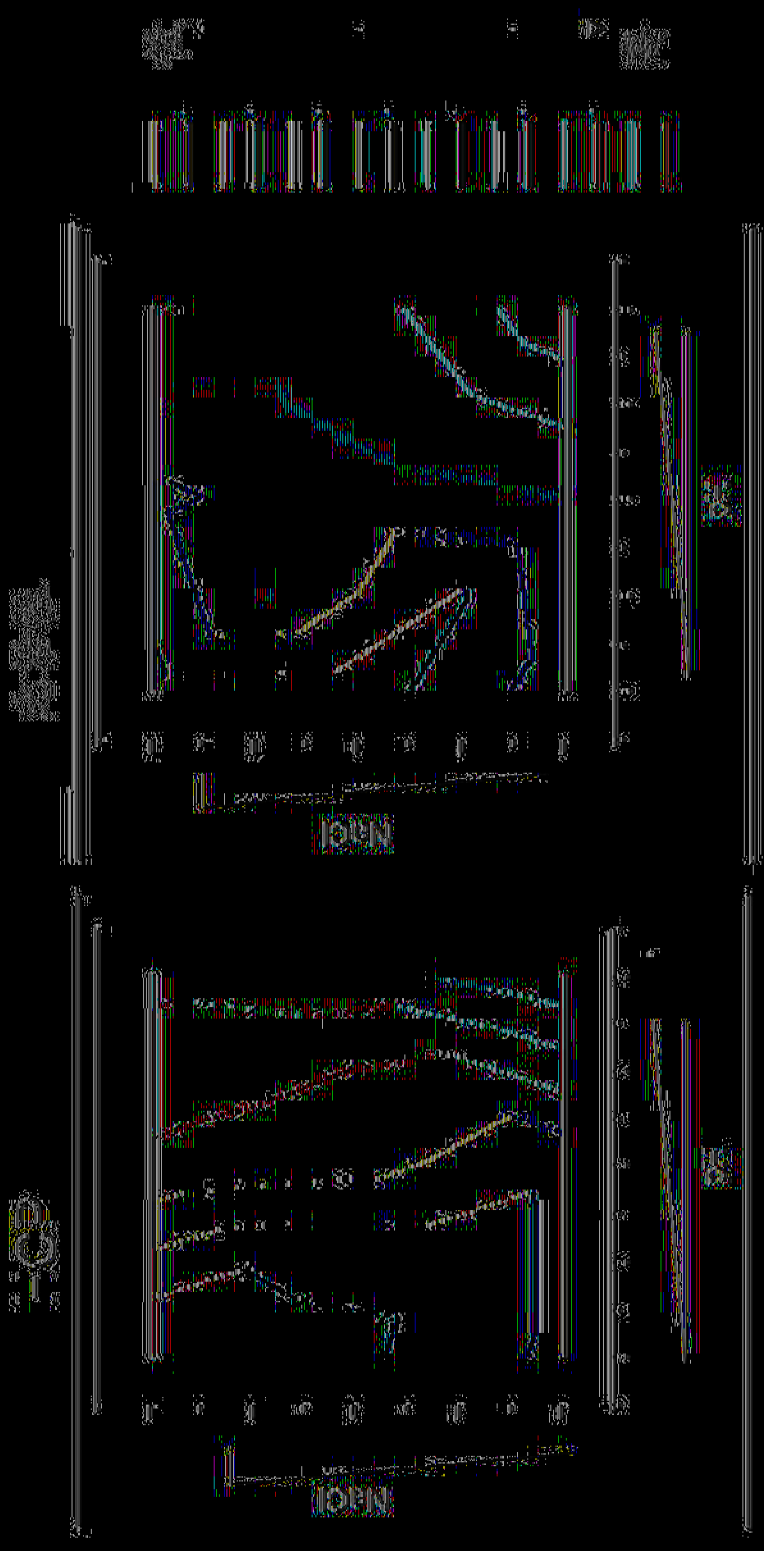


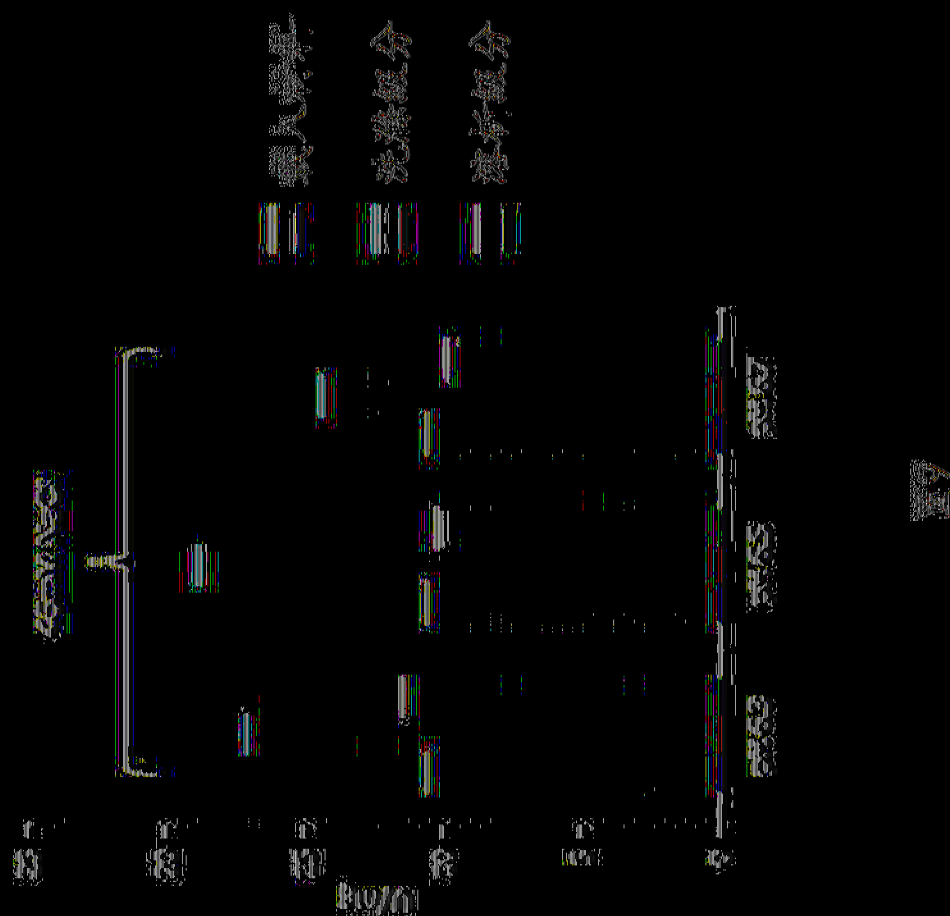


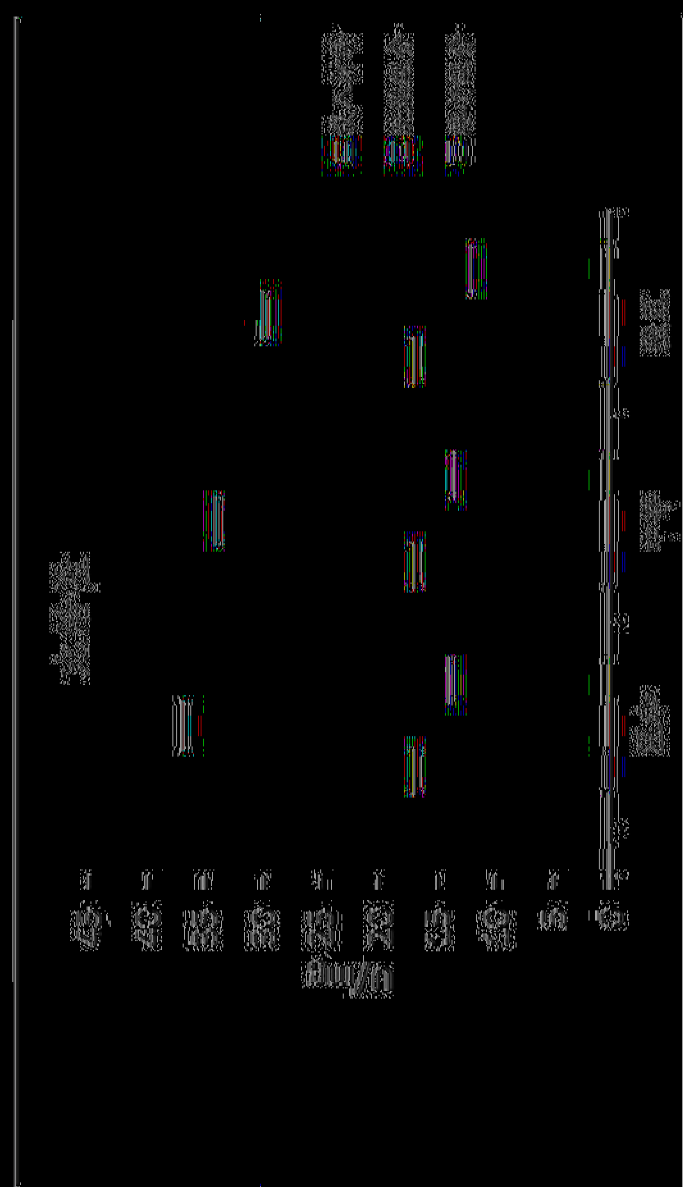
A











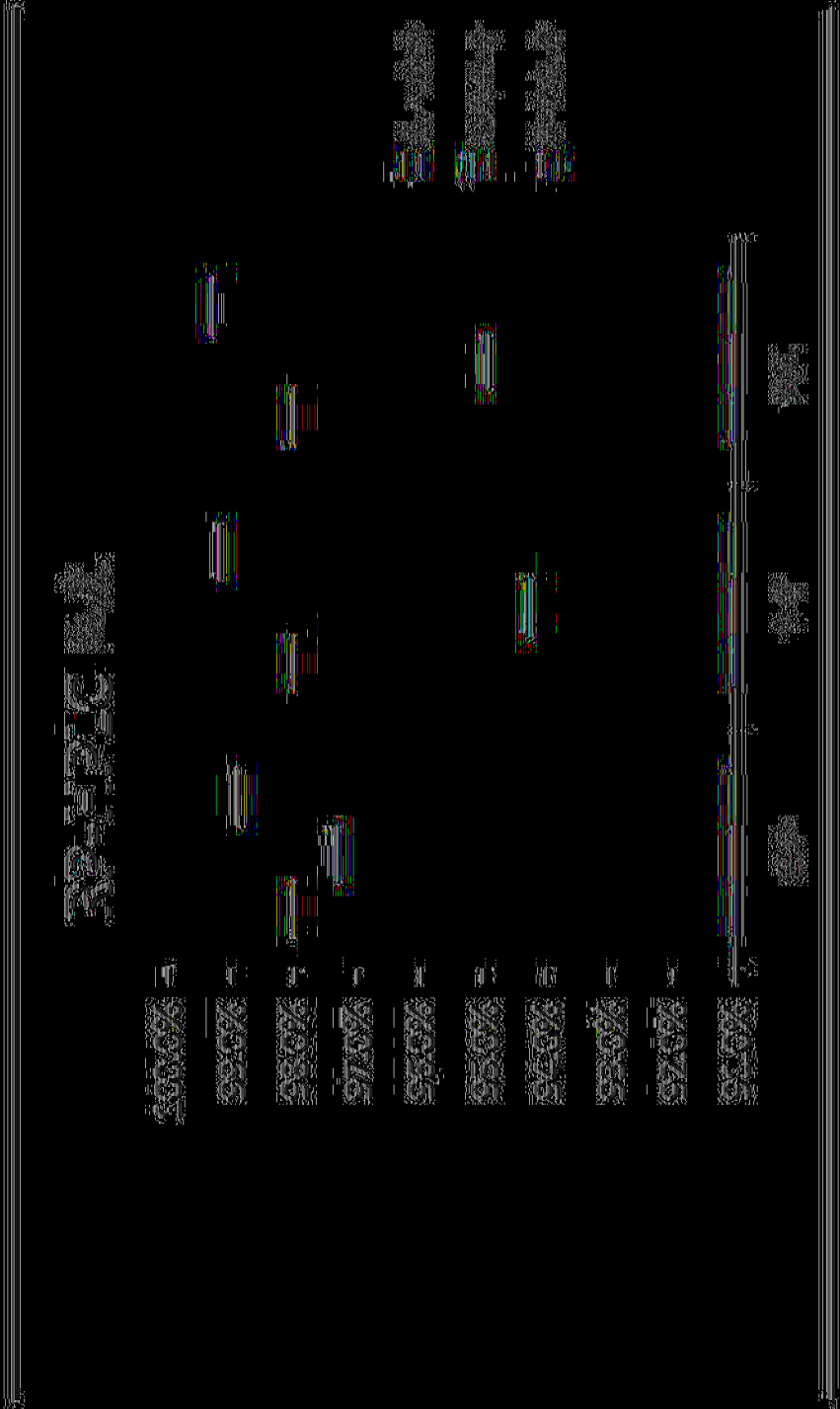
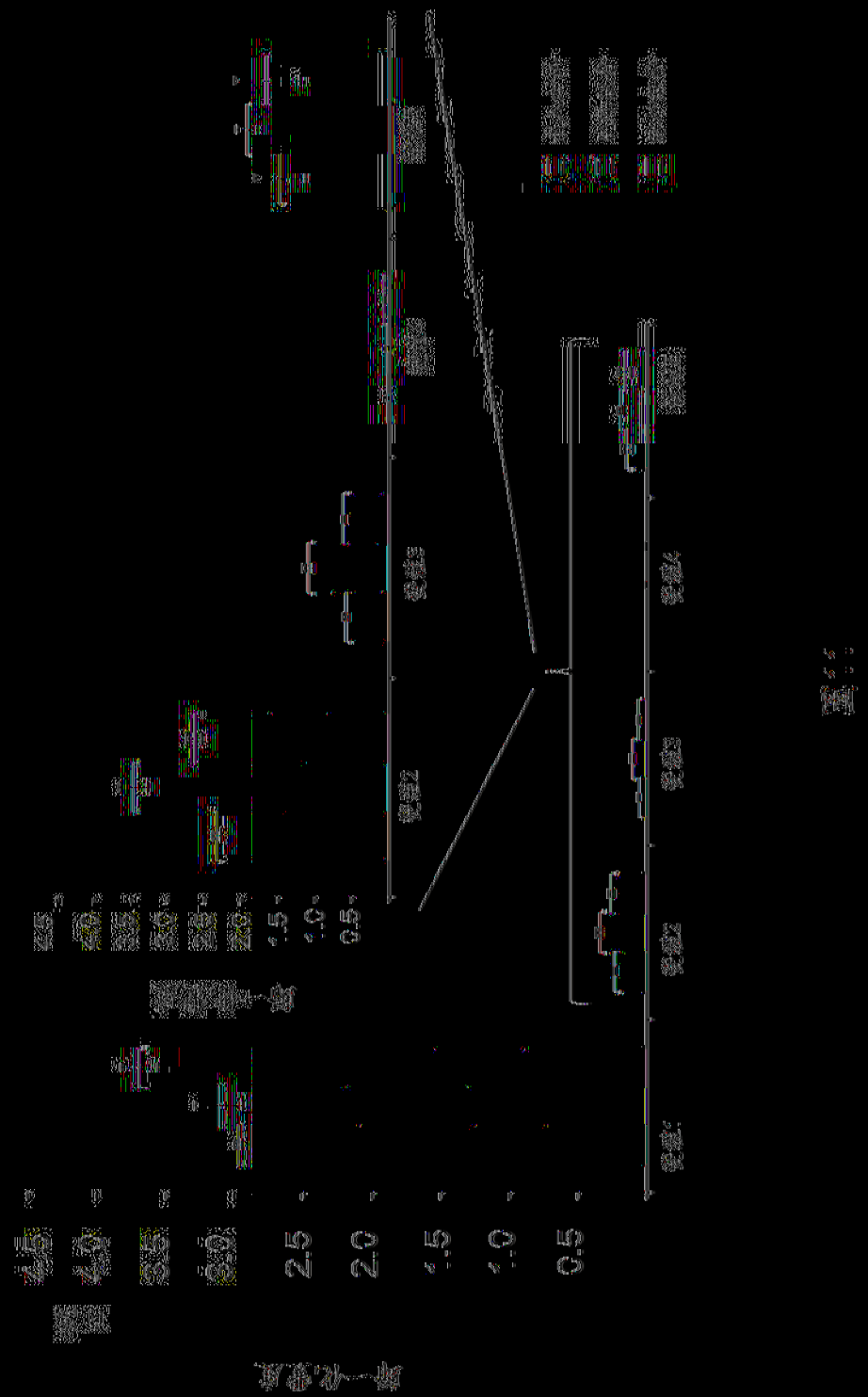
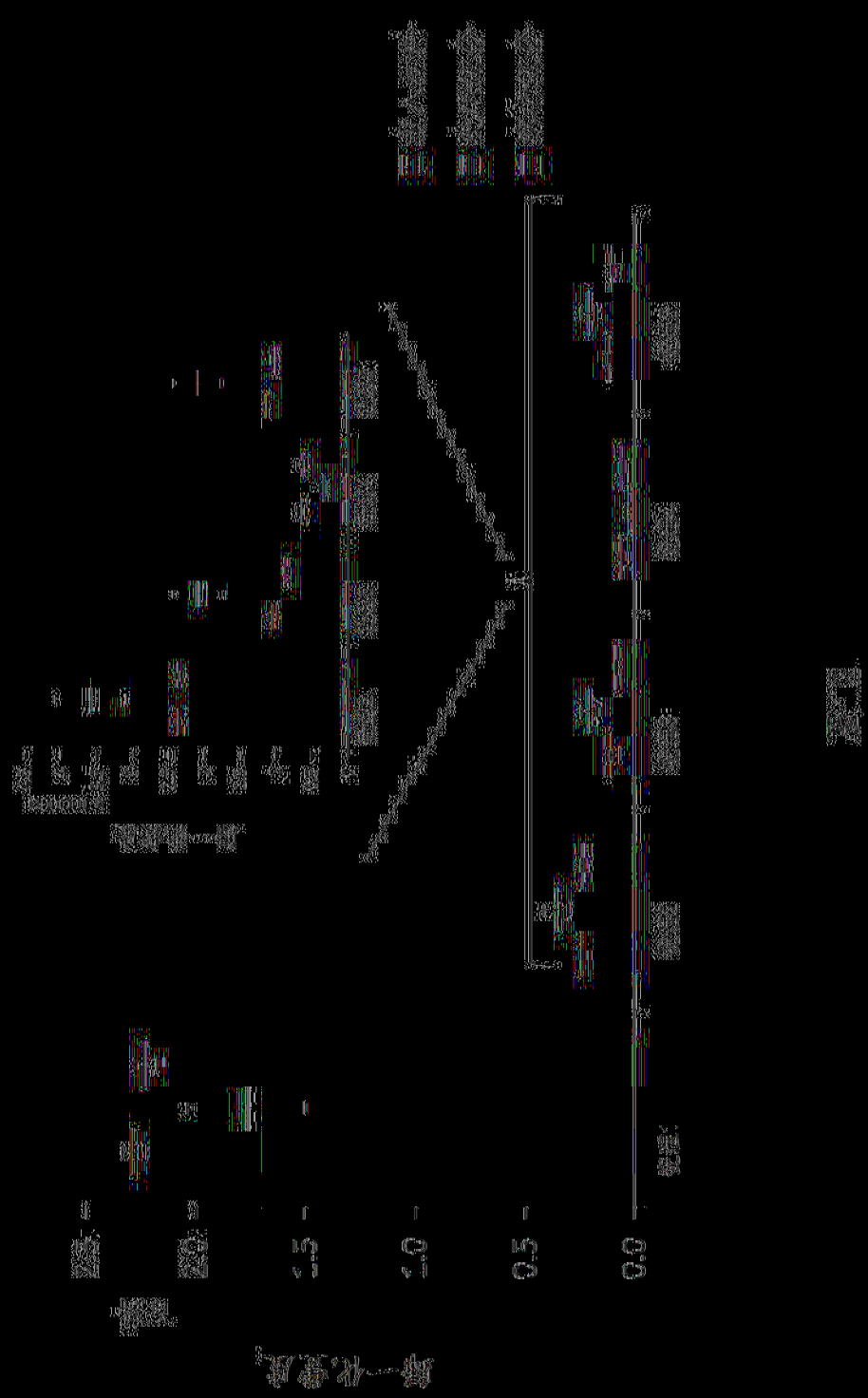
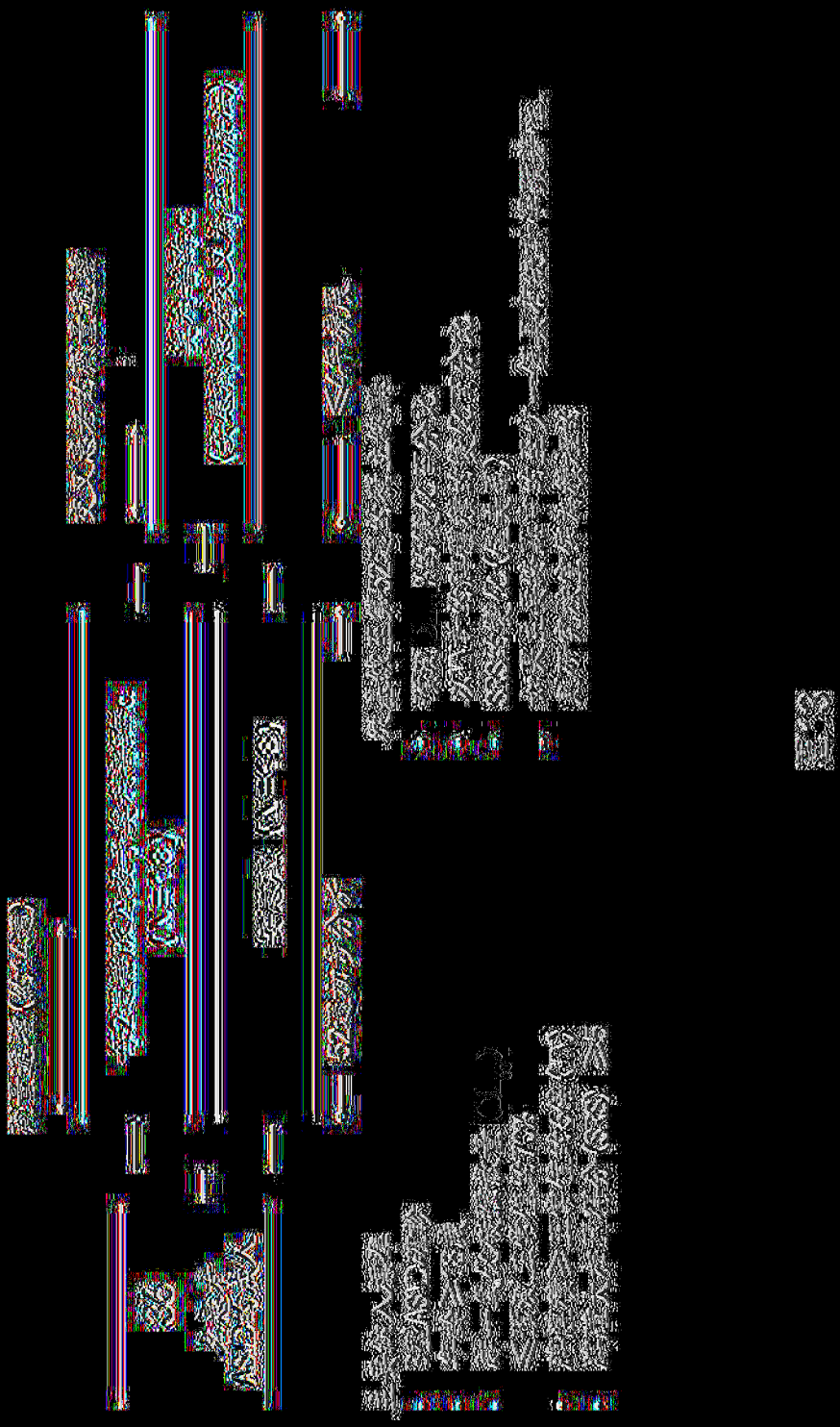
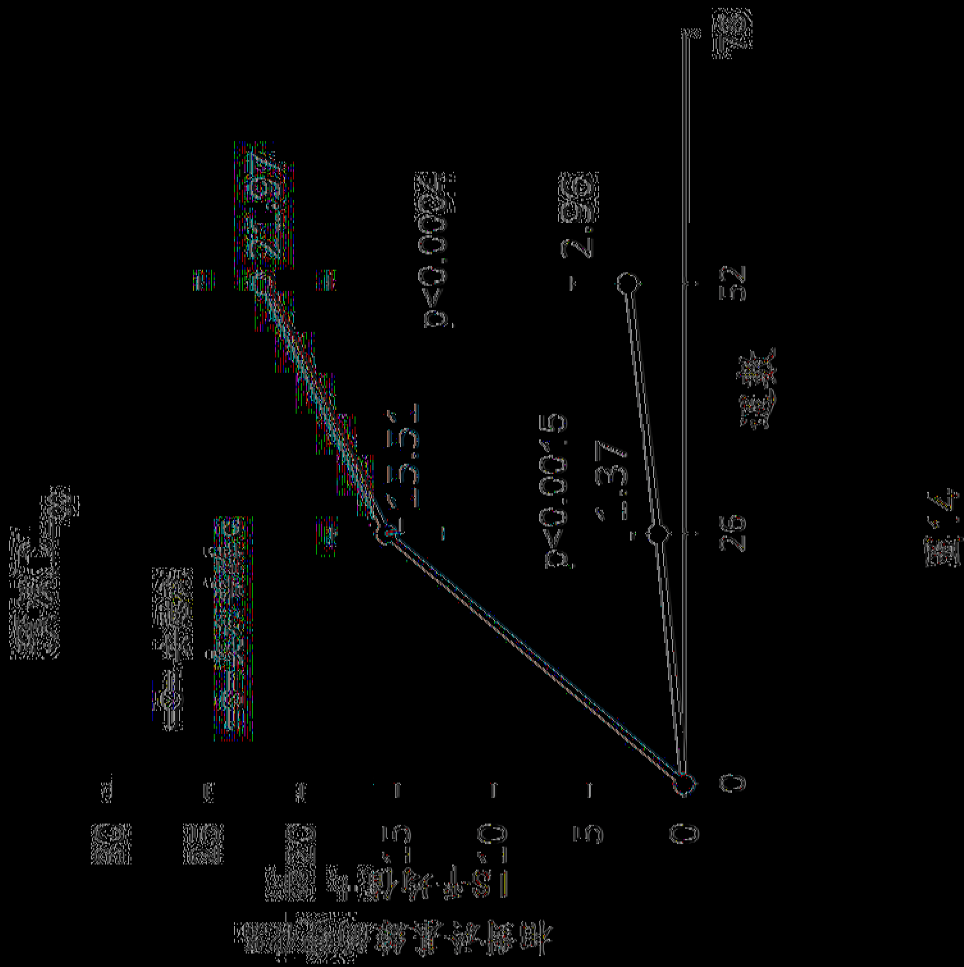


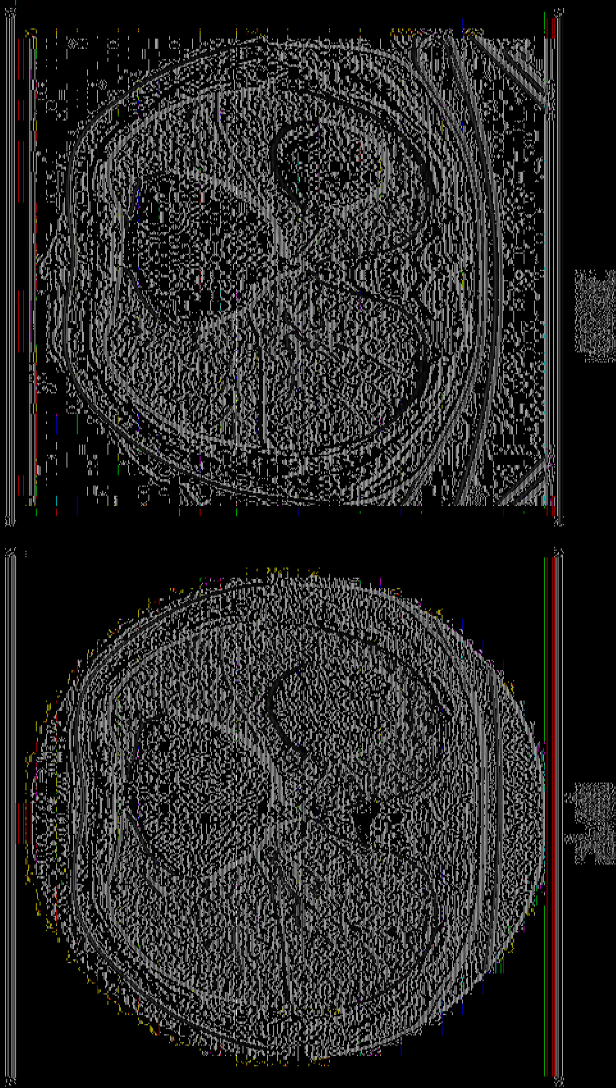
圖 11











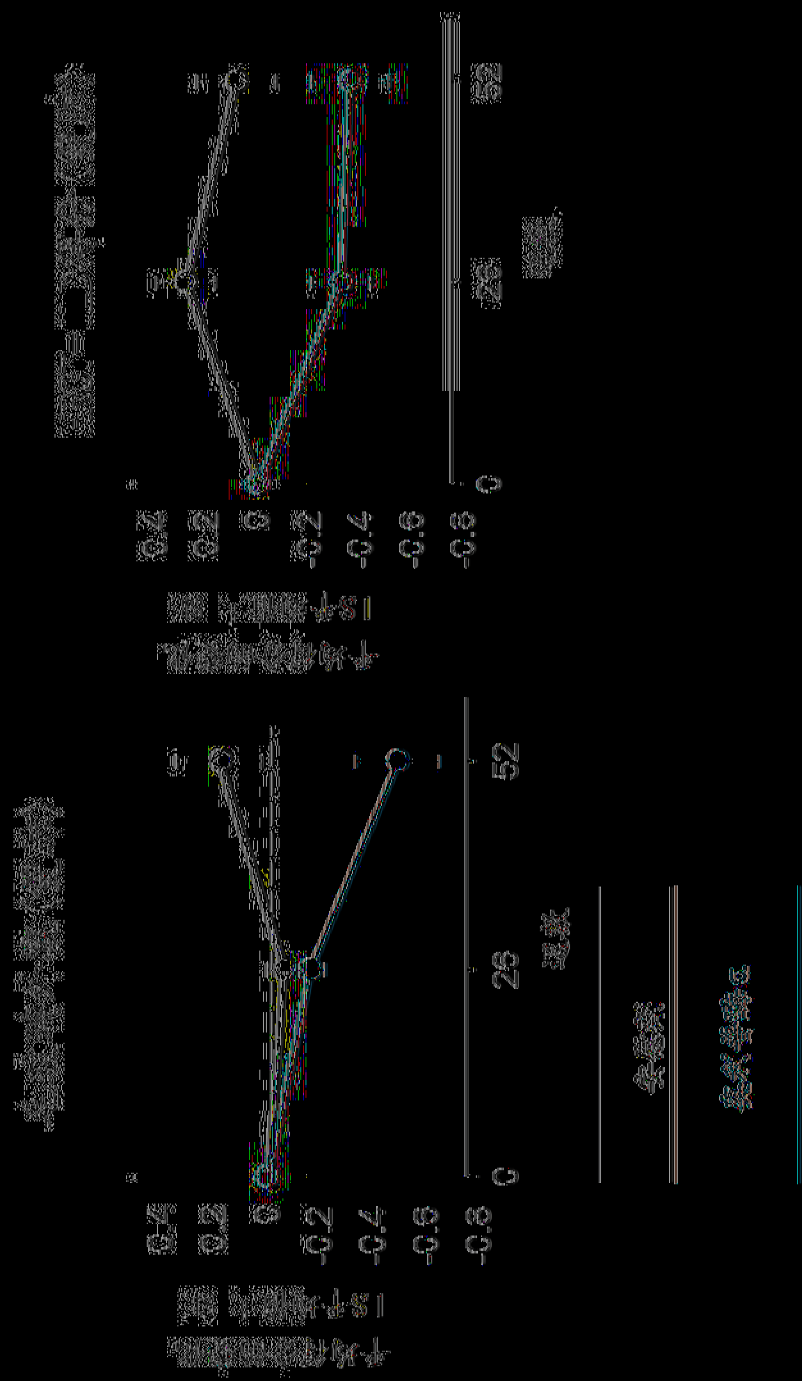


圖 6

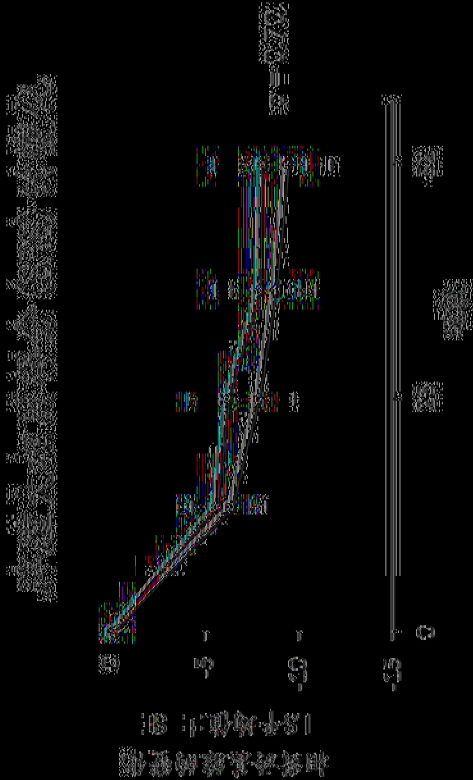
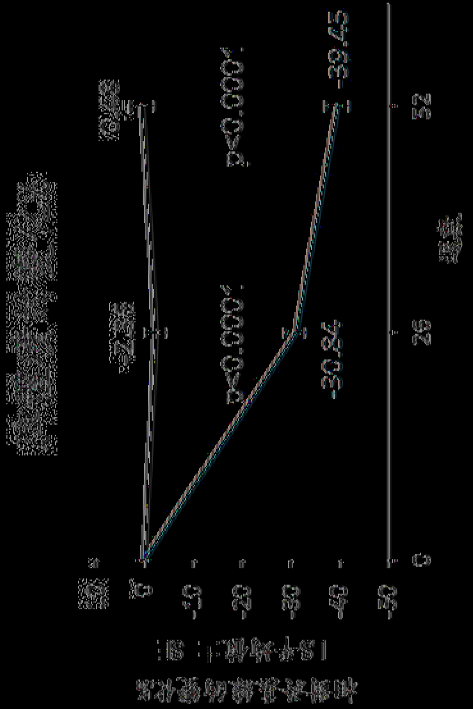
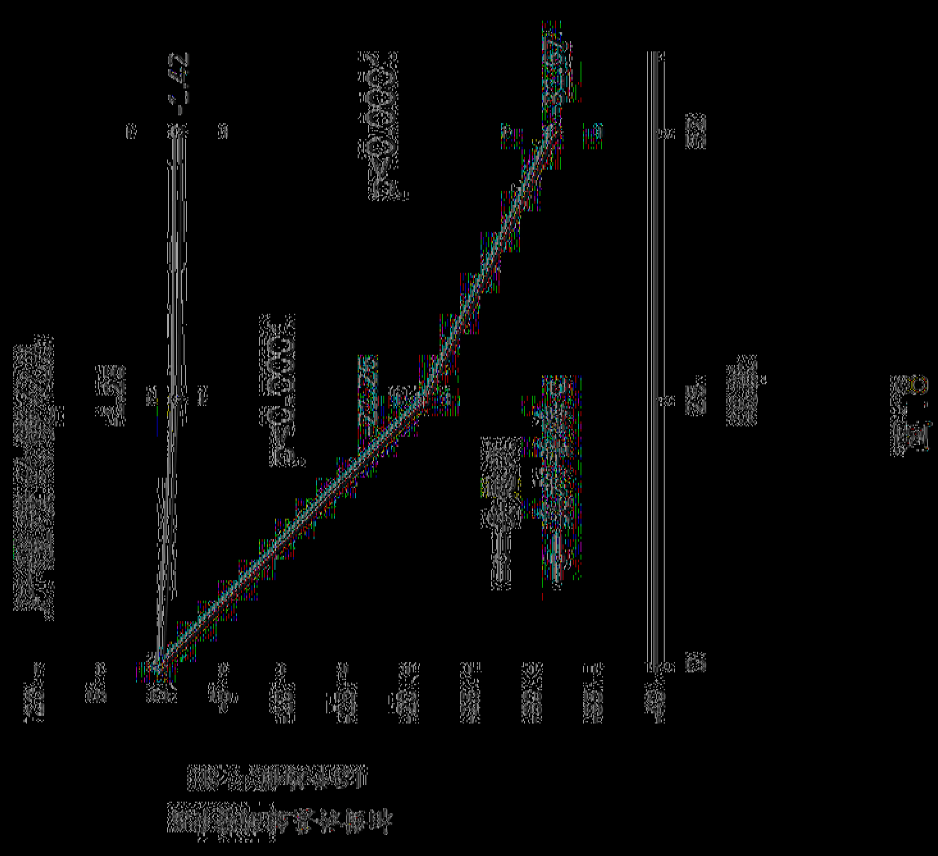
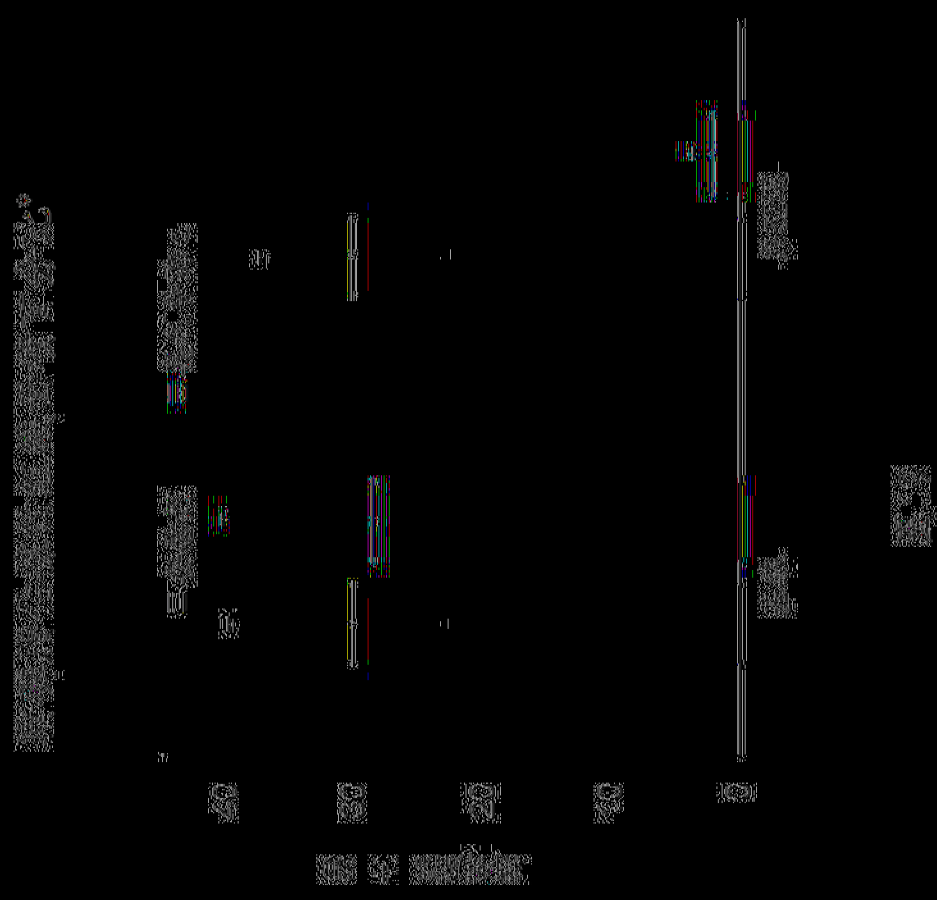
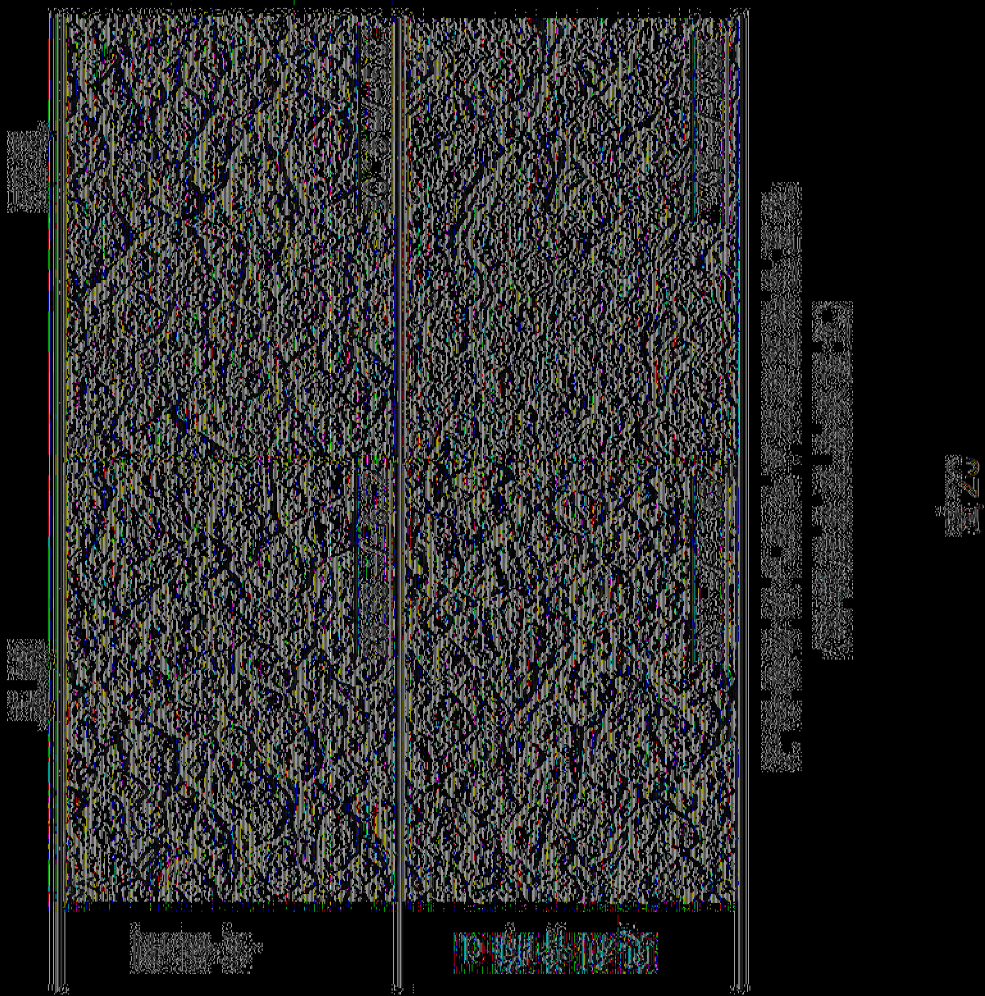


Figure 1









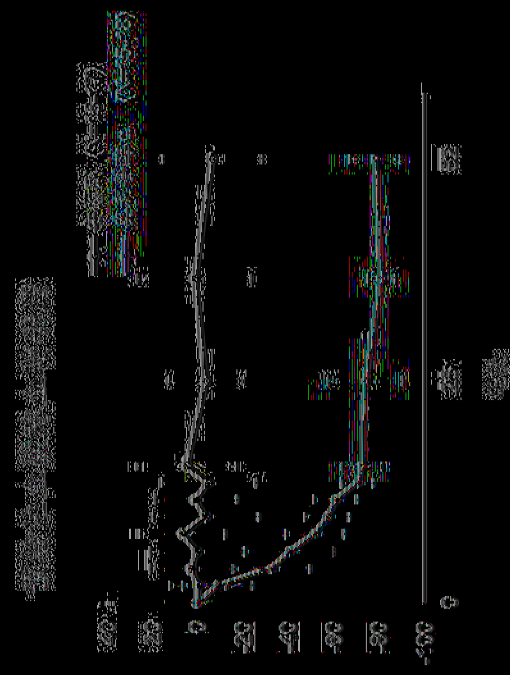


圖 2

