(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156645
(43) 공개일자 2024년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/16 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *B01D 15/18* (2006.01)
B01D 15/20 (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/16 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7034621
(22) 출원일자(국제) 2023년03월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/064657
(87) 국제공개번호 WO 2023/178325
국제공개일자 2023년09월21일
(30) 우선권주장
63/321,636 2022년03월18일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
와실렌코, 토마스 엠.
미국 08807 뉴저지 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 - 메일 코드 55에이-525 사노피 내
브라워, 케빈
미국 08807 뉴저지 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 - 메일 코드 55에이-525 사노피 내
진, 샤오잉
미국 08807 뉴저지 브리지워터 코포레이트 드라이브 55 - 메일 코드 55에이-525 사노피 내
(74) 대리인
양영준, 임근실

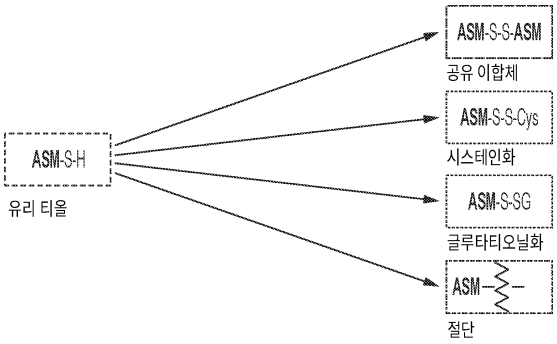
전체 청구항 수 : 총 87 항

(54) 발명의 명칭 **약제학적 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제 조성물 및 방법**

(57) 요 약

원하는 순도, 비활성 및/또는 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼을 갖는 rASM을 포함하는 조성물이 본원에 개시된다. 이러한 조성물을 제조하고 정제하기 위한 방법도 제공되며, 본 방법은 크로마토그래피 단계를 포함한다. 조성물에서 rASM 비활성을 조절하는 방법, 및 조성물에서 rASM 아이소폼을 조절하는 방법이 추가로 제공된다. 본원에 개시된 방법은 산성 스핑고미엘리나제 결핍증(ASMD)을 치료하기 위한 rASM을 포함하는 약제학적 조성물의 제조에 특히 유용할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 3/00 (2018.01)
B01D 15/1871 (2013.01)
B01D 15/203 (2013.01)
B01D 15/362 (2013.01)
B01D 15/3828 (2013.01)
C12Y 301/04012 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM)를 정제하는 방법으로서,

(i) rASM 및 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 단백질 혼합물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계, 또는

rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계, 또는

rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계; 및

(ii) CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단백질 혼합물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에(in tandem) 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단백질 혼합물은 IMAC 및 CEX 크로마토그래피로 동시에 처리되고, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX 크로마토그래피로 처리되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 혼합물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 개별적으로, 그 사이에 하나 이상의 추가적인 단계를 포함하여 처리되는, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물은 혼합물이 CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로 처리되기 전 또는 처리된 후에 하나 이상의 추가적인 정제 컬럼으로 처리되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 잠재적인 바이러스 오염물을 비활성화 및/또는 제거하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM을 농축하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 혼합물은 rASM을 발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 수득되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 킬레이팅 수지인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성(starting specific activity)에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼에 결합된 rASM은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼에 결합된 rASM은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하의 HCP 수준을 갖는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 변형을 갖는 rASM 아이소폼은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로

이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 혼합물은 적어도 100 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산되는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 단백질 혼합물은 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산되는, 방법.

청구항 26

초기 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 조성물에서 rASM의 아이소폼의 상대적 양을 조절하는 방법으로서, 초기 rASM 조성물은 비변형된 rASM 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함하고, 방법은

(i) 초기 rASM 조성물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계, 또는

초기 rASM 조성물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계, 또는

초기 rASM 조성물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계; 및

(ii) CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리되는, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 초기 rASM 조성물은 IMAC 및 CEX 크로마토그래피로 동시에 처리되고, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX로 처리되는, 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 개별적으로, 그 사이에 하나 이상의 추가적인 단계를 포함하여 처리되는, 방법.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)인, 방법.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함하는, 방법.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 킬레이팅 수지 컬럼인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행되는, 방법.

청구항 35

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 37

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 39

제26항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 42

제26항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는, 방법.

청구항 43

제26항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함하는, 방법.

청구항 44

제26항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 변형은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 45

제26항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, rASM을 포함하는 초기 조성물은 적어도 100 L 또는 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산되는, 방법.

청구항 46

비변형된 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함하는 액

체 조성물에서 rASM 비활성을 조절하는 방법으로서,

(i) 액체 조성물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계, 또는

액체 조성물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계, 또는

액체 조성물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계; 및

(ii) CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 액체 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리되거나, 액체 조성물은 IMAC 및 CEX 크로마토그래피로 동시에 처리되고, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX 크로마토그래피로 처리되는, 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 개별적으로, 그 사이에 하나 이상의 추가적인 단계를 포함하여 처리되는, 방법.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)인, 방법.

청구항 50

제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함하는, 방법.

청구항 52

제46항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 킬레이팅 수지 컬럼인, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행되는, 방법.

청구항 54

제46항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 56

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정되는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거되는, 방법.

청구항 58

제46항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는, 방법.

청구항 60

제58항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 가지며, 선택적으로 제제 내의 rASM은 적어도 98%의 순도를 갖는, 방법.

청구항 61

제46항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 수득된 rASM 제제는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는, 방법.

청구항 62

제46항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 변형은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 64

제46항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, rASM을 포함하는 액체 조성물은 적어도 100 L 또는 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산되는, 방법.

청구항 65

비변형된 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼 종을 포함하는 rASM 제제로서, 비변형된 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80%인, rASM 제제.

청구항 66

제65항에 있어서, 비변형된 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 또는 그 초과인, rASM 제제.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 모든 변형된 rASM 아이소폼은 통틀어 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 40% 이하인, rASM 제제.

청구항 68

제67항에 있어서, 모든 변형된 rASM 아이소폼은 통틀어 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8%

이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만인, rASM 제제.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 시스테인화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 10% 이하인, rASM 제제.

청구항 70

제69항에 있어서, C-말단 시스테인화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만인, rASM 제제.

청구항 71

제65항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 5% 이하인, rASM 제제.

청구항 72

제71항에 있어서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 그 미만인, rASM 제제.

청구항 73

제65항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 0.2% 이하인, rASM 제제.

청구항 74

제73항에 있어서, C-말단 S-이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 0.1% 이하인, rASM 제제.

청구항 75

제65항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 8% 이하인, rASM 제제.

청구항 76

제75항에 있어서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하 또는 그 미만인, rASM 제제.

청구항 77

제65항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, rASM 제제는 적어도 95%의 순도를 갖는, rASM 제제.

청구항 78

제65항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, rASM 제제는 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 순도를 갖는, rASM 제제.

청구항 79

제65항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는, rASM 제제.

청구항 80

제79항에 있어서, rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는, rASM 제제.

청구항 81

제65항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, rASM 제제는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖

는, rASM 제제.

청구항 82

제65항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, rASM 제제는 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 제조되었던, rASM 제제.

청구항 83

제65항 내지 제82항 중 어느 한 항의 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 제제를 사용하여 제조된, 약제학적 조성물.

청구항 84

산성 스핑고미엘리나제 결핍증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 산성 스핑고미엘리나제 결핍증을 치료하는 방법으로서, 제65항 내지 제82항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 85

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 rASM을 완충액 교환하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 86

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 8 ± 3℃에서 냉장 조건 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해지는, 방법.

청구항 87

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 주변 온도 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해지는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제와 같은 재조합 산성 스핑고미엘리나제를 제조하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 2022년 3월 18일자로 출원된 미국 가특허 출원 제63/321,636호로부터의 우선권을 주장하며, 그 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0004] 서열 목록

[0005] 본 출원에는 XML 형식으로 전자 제출되었고 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 서열 목록이 포함된다. 2023년 3월 15일에 생성된 서열 목록의 전자 사본은 022548_WO042_SL.xml로 명명되며 32,066 바이트 크기이다.

배 경 기 술

[0006] 산성 스핑고미엘리나제 결핍증(ASMD)은 생명을 위협하는 드문 리소좀 축적 장애이다. 이는 리소좀 효소인 산성 스핑고미엘리나제(ASM)를 인코딩하는 SMPD1 유전자에서의 돌연변이로 인해 초래되는 상염색체 열성 유전 질환이다(Schuchman et al., *Mol Genet Metab.* (2017) 120(1-2):27-33). ASMD 환자는 스핑고미엘린을 대사할 수 없는데, 이는 그 결과 다수의 기관에서 리소좀에 축적되어, 심각한 경우에는 내장 질환 및 신경퇴행을 야기한다. ASMD 환자에서는 비장, 간, 폐 및 골수에서 콜레스테롤 및 다른 지질이 증가되어 왔다.

[0007] 올리푸다제 알파는 성인 및 소아 환자 둘 모두에서 ASMD의 중요한 징후를 유의하게 개선할 수 있는 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제이다. 그러나, 원하는 순도 및 일관된 비활성을 갖는 상업적 규모의 올리푸다제 알파를 포함하는 약제학적 조성물을 생산해야 할 필요성이 여전히 남아 있다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM)를 정제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 (i)

rASM 및 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 단백질 혼합물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계; 또는 rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계; 또는 rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에(in tandem) 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리된다.

[0010] 일부 구현예에서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)이다.

[0011] 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 rASM을 발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 수득된다.

[0012] 일부 구현예에서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함한다.

[0014] 일부 구현예에서, IMAC는 킬레이팅 수지이다.

[0015] 일부 구현예에서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행된다.

[0016] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성(starting specific activity)에 따라 사전결정된다.

[0017] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼 상에 결합된 rASM은 컬럼으로부터 제거된다.

[0018] 일부 구현예에서, CEX 세척 완충액은 표 2a로부터 선택되고, CEX 용출 완충액은 표 2b로부터 선택된다.

[0019] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다.

[0020] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼 상에 결합된 rASM은 컬럼으로부터 제거된다.

[0021] 일부 구현예에서, IMAC 세척 완충액은 표 3으로부터 선택되고, IMAC 용출 완충액은 표 4로부터 선택된다.

[0022] 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는다. 정제된 rASM 제제의 비활성은 실시예 4에 따라 측정된다.

[0023] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 순도를 갖는다.

[0024] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 3.0 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 또는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는다.

[0025] 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함한다.

[0026] 일부 구현예에서, 변형을 갖는 rASM 아이소폼은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 적어도 100 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산된다.

[0028] 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산된다.

[0029] 일부 구현예에서, 방법은 8 ± 3℃에서 냉장 조건 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다. 일부 구현예에서,

방법은 주변 온도 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다.

[0030] 초기 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 조성물에서 rASM의 아이소폼의 상대적 양을 조절하는 방법도 본원에 제공되며, 초기 rASM 조성물은 비변형된 rASM 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 초기 rASM 조성물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계; 또는 초기 rASM 조성물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계; 또는 초기 rASM 조성물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리된다.

[0032] 일부 구현예에서, 초기 rASM 조성물은 IMAC 및 CEX 크로마토그래피로 동시에 처리되고, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX로 처리된다.

[0033] 일부 구현예에서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 개별적으로, 그 사이에 하나 이상의 추가적인 단계를 포함하여 처리된다.

[0034] 일부 구현예에서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)이다. 일부 구현예에서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, IMAC는 킬레이팅 수지 컬럼이다.

[0037] 일부 구현예에서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행된다.

[0038] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다.

[0039] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거된다.

[0040] 일부 구현예에서, CEX 세척 완충액은 표 2a로부터 선택되고, CEX 용출 완충액은 표 2b로부터 선택된다.

[0041] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다.

[0042] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거된다.

[0043] 일부 구현예에서, IMAC 세척 완충액은 표 3으로부터 선택되고, IMAC 용출 완충액은 표 4로부터 선택된다.

[0044] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는다. 정제된 rASM 제제의 비활성은 실시예 4에 따라 측정된다.

[0045] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 3.0 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 또는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는다.

[0046] 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 변형은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 일부 구현예에서, rASM을 포함하는 초기 조성물은 적어도 100 L 또는 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산된다.

[0049] 일부 구현예에서, 방법은 8 ± 3℃에서 냉장 조건 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다. 일부 구현예에서, 방법은 주변 온도 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다.

[0050] 비변형된 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함하는 액체 조성물에서 rASM 비활성을 조절하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 액체 조성물을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계; 또는 액체 조성물을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계; 또는 액체 조성물을 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피 또는 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, 액체 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC로 동시에 처리되고, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리되거나, 액체 조성물은 IMAC 및 CEX 크로마토그래피로 동시에 처리되고, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX 크로마토그래피로 처리된다.

[0052] 일부 구현예에서, 초기 rASM 조성물은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 개별적으로, 그 사이에 하나 이상의 추가적인 단계를 포함하여 처리된다.

[0053] 일부 구현예에서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)이다. 일부 구현예에서, rASM은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0054] 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함한다.

[0055] 일부 구현예에서, IMAC는 킬레이팅 수지 컬럼이다.

[0056] 일부 구현예에서, IMAC는 아연, 구리 또는 니켈로 수행된다.

[0057] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 CEX 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다.

[0058] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 CEX 크로마토그래피 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 CEX 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 CEX 크로마토그래피 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거된다.

[0059] 일부 구현예에서, CEX 세척 완충액은 표 2a로부터 선택되고, CEX 용출 완충액은 표 2b로부터 선택된다.

[0060] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 적어도 하나의 IMAC 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함하고, 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 단백질 혼합물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다.

[0061] 일부 구현예에서, IMAC는 IMAC 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 IMAC 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함하고, 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도 하에서 세척 단계 후 IMAC 컬럼 상에 결합된 모든 종은 컬럼으로부터 제거된다.

[0062] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 45 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는다. 정제된 rASM 제제의 비활성은 실시예 4에 따라 측정된다.

[0063] 일부 구현예에서, 제제에서의 rASM은 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 순도를 갖는다.

[0064] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 3.0 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 또는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는다.

[0065] 일부 구현예에서, 정제된 rASM 제제는 전체 rASM 집단 중 통틀어 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%

이하의 변형을 갖는 rASM 아이소폼을 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, 변형은 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0067] 일부 구현예에서, rASM을 포함하는 액체 조성물은 적어도 100 L 또는 적어도 500 L의 생산 규모를 갖는 생물반응기에서 생산된다.

[0068] 일부 구현예에서, 방법은 8 ± 3℃에서 냉장 조건 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다. 일부 구현예에서, 방법은 주변 온도 하에서 부분적으로 또는 완전히 행해진다.

[0069] 본 개시내용은 비변형된 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼 종을 포함하는 rASM 제제도 제공한다. 일부 구현예에서, 비변형된 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80%이다. 일부 구현예에서, 비변형된 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 또는 그 초과이다.

[0070] 일부 구현예에서, 모든 변형된 rASM 아이소폼은 통틀어 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 10% 이하, 15% 이하, 20% 이하, 25% 이하, 30% 이하, 35% 이하, 또는 40% 이하이다.

[0071] 일부 구현예에서, 모든 변형된 rASM 아이소폼은 통틀어 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만이다.

[0072] 일부 구현예에서, C-말단 시스테인화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 10% 이하이다. 일부 구현예에서, C-말단 시스테인화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만이다.

[0073] 일부 구현예에서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 5% 이하이다. 일부 구현예에서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 그 미만이다.

[0074] 일부 구현예에서, C-말단 이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 0.2% 이하이다.

[0075] 일부 구현예에서, C-말단 S-이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 0.1% 이하이다.

[0076] 일부 구현예에서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 8% 이하이다.

[0077] 일부 구현예에서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하 또는 그 미만이다.

[0078] 일부 구현예에서, rASM 제제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 순도를 갖는다.

[0079] 일부 구현예에서, rASM 제제는 약 5 내지 50 U/mg의 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, rASM 제제는 약 10 내지 20 U/mg의 비활성을 갖는다. 정제된 rASM 제제의 비활성은 실시예 4에 따라 측정된다.

[0080] 일부 구현예에서, 제제에서의 rASM은 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 순도를 갖는다.

[0081] 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 1.0 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 3.0 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 또는 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는다.

[0082] 일부 구현예에서, rASM 제제는 본원에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 제조되었다.

[0083] 본원에 기술된 바와 같은 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 제제를 사용하여 제조된 약제학적 조성물도 제공된다.

[0084] 산성 스핑고미엘리나제 결핍증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 산성 스핑고미엘리나제 결핍증을 치료하는 방법이 추가로 제공되고, 본 방법은 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 정제된 rASM을 완충액 교환하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 변형을 갖거나 갖지 않는 rhASM의 상이한 아이소폼을 도시한다.

도 2(SEQ ID NO: 13 내지 20)는 변형을 갖거나 갖지 않는 rhASM의 C-말단 근처의 구조를 도시한다. rhASM의 C-말단 상태는 MMTS 표지화 후 rhASM 천연 Asp-N 소화물의 LC-MS에 의해 모니터링되었다. rhASM의 C-말단 아미노산만을 나타낸다.

도 3은 rhASM의 농축된 단량체 및 rhASM의 농축된 이합체의 비활성을 도시한다. 각각의 농축된 집단에 대한 순도 퍼센트는 각각의 막대 위에 나타나 있다.

도 4는 총 C-말단 변형의 다양한 상대적 풍부도를 포함하는 rASM 조성물의 비활성을 도시한다.

도 5는 CEX 크로마토그래피 단계에서의 상이한 염(NaCl) 및 pH 조건 하의 HCP 제거율(상부 패널) 또는 회수율(하부 패널)을 도시한다.

도 6은 IMAC 단계에서의 상이한 염(NaCl) 및 pH 조건 하의 HCP 제거율(좌측 패널) 및 회수율(우측 패널)에 대한 등고선 플롯을 도시한다.

도 7은 CEX 크로마토그래피 단계에서의 상이한 염(NaCl) 및 pH 조건 하의 HCP 제거율(상부 패널) 또는 비활성(하부 패널)을 도시한다.

도 8은 IMAC 단계에서의 상이한 염(NaCl) 및 pH 조건 하의 HCP 제거율(좌측 패널) 및 비활성(우측 패널)에 대한 등고선 플롯을 도시한다.

도 9는 CEX 동작의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획 내의 rhASM의 대표적인 비활성을 도시한다. 다수의 세척 조건을 명시된 바와 같이 시험하였다(pH 6.3, pH 6.5 및 pH 6.7에서, 염화나트륨 45 mM).

도 10a는 IMAC 프로세스의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획 내의 rhASM의 비활성을 도시한다.

도 10b는 IMAC 프로세스의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획 내의 rhASM의 순도를 도시한다. 다수의 세척 조건을 시험하였다(온화함: pH 6.6에서 10 mM 인산나트륨; 중간: pH 6.0에서 10 mM 인산나트륨, 20 mM 염화나트륨; 강함: pH 5.8에서 10 mM 인산나트륨, 80 mM 염화나트륨).

도 11은 CEX 동작의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획 내의 rhASM 아이소폼의 대표적인 정규화된 풍부도를 도시한다. 변이체 1: 비변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 2: C-말단 시스테인 시스테인화를 갖는 변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 3: C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 4: 이합체화 형태 1; 변이체 5: C-말단 절단 형태 1. 이들 아이소폼의 세부사항에 대해 표 1을 참조한다.

도 12는 IMAC 동작의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획 내의 rhASM 아이소폼의 대표적인 정규화된 풍부도를 도시한다. 변이체 1: 비변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 2: C-말단 시스테인 시스테인화를 갖는 변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 3: C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 변형된 rhASM 아이소폼; 변이체 4: 이합체화 형태 1; 변이체 5: C-말단 절단 형태 1. 이들 아이소폼의 세부사항에 대해 표 1을 참조한다.

도 13은 ASMD 환자를 치료하기 위해 정제된 rhASM(올리푸다제 알파)을 사용하는 임상 연구를 도시한다.

도 14는 올리푸다제 알파 또는 위약으로 치료된 환자에서 예측된 DL_{CO}의 변화 퍼센트(단위: %)를 도시한다. DLCO = 일산화탄소 확산 능력; FVC = 강제 폐활량

도 15는 올리푸다제 알파 치료 전(좌측 패널) 및 후(우측 패널)의 폐의 고해상도 컴퓨터 단층촬영(HRCT) 스캔을 도시한다. 스핑고미엘린으로 충전된 대식세포는 간유리 음영으로 관찰된다.

도 16은 양쪽 폐에서의 HSCT 간유리 모양 점수(좌측 패널) 및 간질성 폐 질환 점수(우측 패널)가 올리푸다제-알파-치료된 환자에서는 평균 개선을 나타냈지만 위약-치료된 환자에서는 그렇지 않았음을 도시한다.

도 17은 올리푸다제-알파-치료된 환자에서 비장 체적의 변화%(좌측 패널) 및 비장비대 관련 점수의 변화(우측 패널)를 도시하지만, 위약-치료된 환자에서는 그렇지 않았다.

도 18은 간 체적의 변화%를 도시한다. ALT: 알라닌 아미노트랜스퍼라제; AST: 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제; HDL-C: 고밀도 지질단백질 콜레스테롤; LDL-C: 저밀도 지질단백질 콜레스테롤; MN: 정상의 배수.

도 19는 위약 또는 올리푸다제 알파로 치료된 환자로부터 수득된 조직에서 스핑고미엘린이 차지하는 조직 면적

퍼센트를 도시한다.

도 20은 위약 또는 올리푸다제 알파로 치료된 환자에서의 간 생검의 대표적인 톨루이딘 블루 염색 이미지를 도시한다(스핑고미엘린은 어두운 염색으로 나타남).

도 21은 위약으로 치료된 환자 및 올리푸다제 알파로 치료된 환자 둘 모두에서의 정규화된 혈장 키토트리오시다제(좌측 패널), 및 두 집단 모두에서의 주입-전 혈장 리소-스핑고미엘린 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 본 발명을 설명하기 전에, 본 발명은 설명된 특정 방법 및 실험 조건이 변할 수 있으므로 이러한 방법 및 조건으로 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술하기 위한 것이며, 첨부된 청구범위에 의해서만 본 발명의 범주가 제한될 것이기 때문에, 제한하려는 것은 아님을 이해해야 한다.

[0087] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0088] 측정 가능한 값, 예컨대, 양, 시간적 지속기간 등을 지칭할 때 본원에 사용된 바와 같은 "약"은, 명시된 값으로부터 ±5%, ±1% 및 ±0.1%를 포함하여 +20% 또는 ±10%의 차이를 포괄하는 것을 의도하며, 이러한 차이는 개시된 방법을 수행하기에 적절하다.

[0089] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 폴리펩티드는 천연(조직-유래) 기원이거나, 원핵 또는 진핵 세포 제제로부터의 재조합 또는 천연 발현이거나, 합성 방법을 통해 화학적으로 생산될 수 있다. 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공적인 화학적 모방체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 천연 발생 아미노산 중합체 및 비-천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와는 상이하지만 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 구조를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다. 비-천연 잔기는 과학적 및 특허 문헌에 잘 기술되어 있다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 "펩티드"는 본원에 구체적으로 예시된 펩티드의 보존적 변이인 펩티드를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "보존적 변이"는 아미노산 잔기를 생물학적으로 유사한 다른 잔기로 대체하는 것을 나타낸다. 보존적 변이의 예는 하나의 소수성 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 시스테인, 글리신, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신, 노르류신 또는 메티오닌을 다른 것으로 치환하는 것, 또는 하나의 극성 잔기를 다른 것으로 치환하는 것, 예컨대, 아르기닌을 리신으로, 글루탐산을 아스파르트산으로, 또는 글루타민을 아스파라긴으로 치환하는 것 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 서로 치환될 수 있는 중성 친수성 아미노산은 아스파라긴, 글루타민, 세린 및 트레오닌을 포함한다. "보존적 변이"는, 치환된 폴리펩티드에 대해 생성된 항체 또한 비치환된 폴리펩티드와 면역반응하는 경우, 비치환된 모 아미노산 대신 치환된 아미노산을 사용하는 것도 포함한다. 이러한 보존적 치환은 본 발명의 펩티드의 부류의 정의 내에 있다.

[0091] 단백질과 관련하여 사용될 때 "재조합"은 단백질이 숙주 세포 내로의 이종 핵산의 도입에 의해 생산되었음을 나타낸다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같이, "로드"는 크로마토그래피 재료 상에 로딩된 조성물이다. 로딩 완충액은 관심 생성물을 포함하는 조성물을 크로마토그래피 재료 상에 로딩하기 위해 사용되는 완충액이다. 크로마토그래피 재료는 정제될 조성물을 로딩하기 전에 평형 완충액으로 평형화될 수 있다. 일부 예에서, 세척 완충액은 조성물을 크로마토그래피 재료 상에 로딩한 후, 그리고 고체상으로부터 관심 폴리펩티드의 용출 전에 사용된다. 그러나, 관심 생성물, 예를 들어, 폴리펩티드 중 일부는 세척 완충액에 의해 크로마토그래피 재료로부터(즉, 통과액(flow-through)에서) 제거될 수 있다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, "용출"은 크로마토그래피 재료로부터 생성물, 예를 들어, 폴리펩티드를 제거하는 것이다. 용출 완충액은 크로마토그래피 재료로부터 폴리펩티드 또는 다른 관심 생성물을 용출하기 위해 사용되는 완충액이다. 많은 경우에, 용출 완충액은 로드 완충액과는 상이한 물리적 특성을 갖는다. 예를 들어, 용출 완충액은 로드 완충액과는 상이한 전도도를 갖거나 로드 완충액과 상이한 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 로드 완충액보다 더 낮은 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 로드 완충액보다 더 높은 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 로드 완충액보다 더 낮은 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 로드 완충액보다 더 높은 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 로드 완충액과는 상

이한 전도도 및 상이한 pH를 갖는다. 용출 완충액은 더 높거나 더 낮은 전도도 및 더 높거나 더 낮은 pH의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0094] "전도도"는 수용액이 두 전극 사이에서 전류를 전도하는 능력을 지칭한다. 용액에서, 전류는 이온 수송에 의해 흐른다. 따라서, 수용액에 존재하는 이온의 양이 증가함에 따라, 용액은 더 높은 전도도를 가질 것이다. 전도도에 대한 기본 측정 단위는 지멘(Siemen)(또는 mho), mho(mS/cm)이며, Orion 전도도 측정기의 다양한 모델과 같은 전도도 측정기를 사용하여 측정될 수 있다. 전해질 전도도는 전류를 전달하는 용액 내의 이온의 용량이기 때문에, 용액의 전도도는 그 안의 이온의 농도를 변화시킴으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 용액 내의 완충제의 농도 및/또는 염(예를 들어, 염화나트륨, 아세트산나트륨 또는 염화칼륨)의 농도는 원하는 전도도를 달성하기 위해 변경될 수 있다. 바람직하게는, 다양한 완충액의 염 농도는 원하는 전도도를 달성하도록 변형된다.

[0095] "숙주 세포 단백질"(HCP)은 폴리펩티드가 생산된 세포로부터의 단백질이다. 예를 들어, CHOP는 숙주 세포로부터의 단백질, 즉 중국 햄스터 난소 단백질이다. CHOP의 양은 효소-결합 면역흡착 검정("ELISA") 또는 질량 분석법에 의해 측정될 수 있다. 본원에 기술된 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, HCP(예를 들어, CHOP)의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. HCP의 양은 약 10% 내지 99%, 30% 내지 95%, 30% 내지 99%, 50% 내지 95%, 50% 내지 99%, 75% 내지 99%, 또는 85% 내지 99% 중 임의의 것만큼 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, HCP의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 98% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 내의 HCP의 양을 정제 단계(들) 전의 조성물 내의 HCP의 양과 비교함으로써 결정된다.

[0096] 본 개시내용은 재조합 인간 ASM(rhASM)과 같은 재조합 ASM을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, rhASM은 올리푸다제 알파이다. 본 개시내용의 조성물은 우수한 균일성 및 순도를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물, 즉, 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하면서, 환자에서 유의하게 독성이거나 그렇지 않으면 활성 성분과 관련되지 않은 원치 않는 부작용을 야기하는 추가적인 성분을 함유하지 않도록 이러한 형태로 존재하거나 이러한 형태가 되도록 제조될 수 있는 조성물이다. 용어 "약제학적 조성물" 및 "약제학적 제제"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 ASM 결핍증을 갖는 환자를 치료하는 데 유용하다.

[0097] 약물-물질 일관성은 약물 물질/활성 약제학적 성분의 제조에서의 최종 단계에 대한 중요한 고려 사항이다. 이는 배치 간에 일관된 효능이 반드시 유지되도록 하여, 품질을 보장한다. 배치의 전체 내용물이 균질하고 배치 간에 일관성이 있는지 보장하기 위한 연구가 필요하다.

[0098] 정제 프로세스 동안, 우수한 숙주 세포 단백질 제거율을 초래하는 조건은 생성물의 비활성에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명자들은 최종 생성물에서의 비활성이 정제 프로세스에서 잘 제어되는 것을 보장하기 위한 중요한 단계를 식별하기 위한 연구를 수행하였다. 그 결과, 본 발명자들은 비변형된 rhASM 및 변형된 rhASM 아이소폼의 상대적 양을 조절함으로써 rhASM 생성물에서 rhASM 아이소폼의 비율(예를 들어, 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 C-말단 절단을 포함하는 C-말단 시스테인 변형을 갖는 rhASM 아이소폼)을 제어하는 방식을 발견하였고, 그에 의해 최종 생성물의 비활성을 제어하였다. 이 발견은 생성물 품질 및 프로세스 성능의 강력하고 효과적인 제어로 이어진다.

[0099] *재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제*

[0100] ASM은 스핑고미엘린의 세라미드 및 포스포릴콜린으로의 분해를 촉매하는 효소이다. "재조합 인간 ASM"은 재조합 수단에 의해 제조되는, 야생형 서열에 비해 특정 아미노산 변형을 갖거나 갖지 않는 인간 ASM을 지칭한다. 예를 들어, 재조합 인간 ASM은 배양된 포유류 숙주 세포(예를 들어, COS, CHO, HeLa, 3T3, 293T, NSO, SP2/0, 또는 HuT 78 세포 등)에서 또는 인간 ASM 코딩 서열에 대해 유전자 이식된 동물에서 발현될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 재조합 인간 ASM은 올리푸다제 알파이다. 올리푸다제 알파는 CHO 세포에서 생산되는 인간 ASM(EC-3.1.4.12)의 당형태 알파이다. 성숙 올리푸다제 알파는 천연 인간 단백질의 효소 및 리소좀 표적화 활성을 보유하는 570 개 아미노산 폴리펩티드이다. 리더 서열(잔기 1 내지 57)을 포함하는 올리푸다제 알파의 아미노산 서열은 아래에 SEQ ID NO: 1로서 표시되어 있으며, 여기서 리더 서열은 이탤릭체이면서 볼드체이다. 성숙 올리푸다제 알파 서열(SEQ ID NO: 1의 잔기 58 내지 627에 걸쳐 있는 SEQ ID NO: 2)은 리더 서열을 갖지 않는다.

MARYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLALALALALALSDSRVLWAPAEAHPLSP
QGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKIA
PPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPPKP
PSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPGAGYWGEYSKC
DLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPV
YPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRTLRIGGFYALSPYPG
LRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWS
WNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNPGYRVY
QIDGNYSGSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLVYRM
RGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLMPDGSLPEAQSL
WPRPLFC (SEQ ID NO: 1)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCN
LLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPK
PPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPGAGYWG
EYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFL
GPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRTLRIGGFYAL
SPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHC
LKSWSWNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAFLAPSATTYIGLNP
[0102] GYRVYQIDGNYSGSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHN

LVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSARADSPALCRHLMPDGSLP
[0103] EAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 2)

[0104] 다른 구현예에서, 본 발명에 유용한 인간 ASM은 올리푸다제 알파와 아미노산 서열이 99%, 98%, 97%, 96%, 또는 95% 동일하다. 예를 들어, 조성물 내의 인간 ASM은 미국 특허 제6,541,218에 표시된 서열을 가질 수 있으며, 그 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 해당 서열(SEQ ID NO: 3)은 아래에 표시되어 있고, 리더 서열(잔기 1 내지 59)은 이탤릭체이면서 볼드체이며, 여기서 성숙 단백질(SEQ ID NO: 3의 잔기 60 내지 629에 걸쳐 있는 SEQ ID NO: 4)은 리더 서열을 갖지 않는다.

MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALSDSRVLWAPAEAH
PLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSRSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 3)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESIPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSRSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
[0105] ADSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 4)

[0106] 조성물 내의 인간 ASM은 또한 서열 P17405-1로서 UNIPROT 데이터베이스에 개시된 인간 ASM 또는 이의 다형성 변이체와 아미노산 서열이 동일할 수 있다. P17405-1 서열은 아래에 표시되어 있고(SEQ ID NO: 5), 리더 서열(잔기 1 내지 59)은 이탤릭체이면서 볼드체이며, 여기서 성숙 단백질(SEQ ID NO: 5의 잔기 60 내지 629에 걸쳐 있는 SEQ ID NO: 6)은 리더 서열을 갖지 않는다.

MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLALALALALALSDSRVLWAPAEAH
PLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRT
[0107] LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV

HIIGHIPPGHCLKSWSWNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 5)

HPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLC
NLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPT
VPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTDLHWDHDYLEGTDPDCADPLCCRRGSGLPPASRPG
AGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVT
ALVRKFLGPVPVYPAVGNHESTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLPAEALRT
LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFCSRENFWLLINSTDPAGQLQWLVGELQAAEDRGDKV
HIIGHIPPGHCLKSWSWNYYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAVAF
LAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVLDHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRAR
ETYGLPNTLPTAWHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCAQLSAR
ADSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 6)

[0108]

[0109] rhASM DNA, 진단 방법 및 rhASM 단백질은 미국 특허 제5,773,278호, 미국 특허 제5,686,240호, 및 미국 특허 제6,541,218호에 의해 커버되며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0110] 숙주 세포에서 생산된 재조합 인간 ASM(rhASM)은 하나 이상의 아이소폼의 혼합물로서 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 아이소폼은 도 1 및 도 2에 나타나 있으며, 아래의 표 1에도 요약되어 있다. C-말단 변형된 종의 C-말단 상태 및 상대적인 비율은 LC-MS 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0111] [표 1]

[0112] **rhASM 아이소폼**

아이소폼	C-말단 서열만*
비변형된 형태 (C-말단에 유리 티올을 갖는 단량체)	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7)
이합체화 형태 1	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF**C** (SEQ ID NO: 7) | ...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF**C** (SEQ ID NO: 7)
이합체화 형태 2	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF**C** (SEQ ID NO: 7) | ...DSPAL**C**RHLMPDGSLPEAQSLWPRPLFC (SEQ ID NO: 7)
S-글루타티오닐화	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF**C:GSH** (SEQ ID NO: 8)
시스테인화	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF**C:Cys** (SEQ ID NO: 9)
C-말단 절단 형태 1	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPLF (SEQ ID NO: 10) (C 결실됨)
C-말단 절단 형태 2	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRPL (SEQ ID NO: 11) (FC 결실됨)
C-말단 절단 형태 3	...DSPALCRHLMPDGSLPEAQSLWPRP (SEQ ID NO: 12) (LFC 결실됨)
*(SEQ ID NO: 1 의 위치 600, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 또는 SEQ ID NO: 6 의 위치 543, 또는 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 5 의 위치 602 에서 시작하는 rhASM 아미노산만을 나타냄)	

[0113]

[0114] *세포 배양의 방법*

[0115] 중국 햄스터 난소 세포와 같은 숙주 세포에서 재조합 ASM의 발현을 위한 조성물 및 방법은 미국 특허 제5,773,278호에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 생물학적으로 활성인 ASM을 발현하기 위해, 효소에 대한 코딩 서열, 기능적 등가물, 또는 변형된 서열은 적절한 발현 벡터, 즉 적절한 숙주 세포에서 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 벡터에 삽입될 수 있다. 적절한 프로세싱, 즉 신호 절단, 글리코실화, 인산화 및 단백질 분류를 위한 세포 기구 및 요소를 보유하는 숙주 세포 발현 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 포유류 숙주 세포 발현 시스템은 적절하게 접히고 프로세싱되는 생물학적으로 활성인 효소의 발현에 사용될 수 있다. 인간에서 투여되는 경우, 이러한 발현 생성물은 적절한 조직 표적화를 나타내야 하며, 면역학적 이상 반응을 나타내지 않아야 한다.

[0116] 당업자에게 잘 알려진 방법이 ASM 코딩 서열 및 적절한 전사/번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 작제하기 위해 사용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합/유전적 재조합을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory, N.Y., Chapter 12 (1982)]에 기술된 기법을 참조한다.

[0117] 박테리아 시스템에서, 발현된 ASM 단백질에 대해 의도된 용도에 따라 다수의 발현 벡터가 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 대량의 ASM을 생산해야 할 때, 용이하게 정제되는 높은 수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, ASM 코딩 서열이 lac Z 코딩 영역과 프레임 내에서 벡터 내로 결찰될 수 있고 그에 따라 하이브리드 AS-lac Z 단백질이 생산되는 이. 콜라이(*E. coli*) 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., *EMBO J.* (1983) 2:1791); pIN 벡터(Inouye & Inouye, *Nucleic acids Res.* (1985) 13:3101-9; Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem.* (1989) 264:5503-9) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0118] 다양한 진핵 숙주-발현 시스템이 ASM 코딩 서열을 발현하기 위해 활용될 수 있다. 원핵 시스템은 조작의 용이성 및 저비용의 스케일-업이라는 뚜렷한 이점을 제공하지만, ASM의 발현에서 이들의 주요 단점은 이들이 발현된 포유류 단백질의 적절한 번역-후 변형을 결여한다는 것이다. 진핵 시스템, 바람직하게는 포유류 발현 시스템은 적절한 변형이 일어나는 것을 가능하게 한다. 일차 전사물의 적절한 프로세싱, 예를 들어, 글리코실화, 인산화, 및 유전자 생성물의 유리한 분비를 위한 세포 기구를 보유하는 진핵 세포는 ASM의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용되어야 한다. 포유류 세포주가 바람직하다. 이러한 숙주 세포주는 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, -293, WI38 등을 포함하나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0119] 재조합 단백질의 장기간의 고-수율 생산을 위해, 안정한 발현이 사용될 수 있다. 예를 들어, 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포는 농축된 배지에서 1 내지 2 일 동안 성장하게 될 수 있고, 그 후 선택적 배지로 스위칭될 수 있다. 바이러스 복제 원점을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신, 숙주 세포는 적절한 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 제어되는 ATN 또는 DNA, 및 선택 가능한 마커로 형질전환될 수 있다. 재조합 플라스미드에서의 선택 가능한 마커는 선택에 대한 저항성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체 내로 안정적으로 통합하고 성장하여 군집(foci)을 형성하는 것을 가능하게 하고, 이는 결국 클로닝되고 세포주로 확장될 수 있다. 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(Wigler et al., *Cell* (1977) 11:223), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1962) 48:2026), 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy et al., *Cell* (1980) 22:817) 유전자를 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 선택 시스템이 각각 tk-, hgprt- 또는 aprt- 세포에 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 저항성은, 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 dhfr(Wigler et al., *Proc Natl Acad Sci. USA* (1980) 77:3567; O'Hare et al., *Proc Natl Acad Sci. USA* (1981) 78:1527); 미코페놀산에 대한 저항성을 부여하는 gpt(Mulligan & Berg, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1981) 78:2072); 아미노글리코시드 G-418에 대한 저항성을 부여하는 neo(Colberre-Garapin et al., *J Mol Biol.* (1981) 150:1); 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 hygro(Santerre et al., *Gene* (1984) 30:147) 유전자에 대한 선택의 기초로서 사용될 수 있다. 최근에, 추가적인 선택 가능한 유전자, 즉, 세포가 트립토판 대신 인돌을 활용할 수 있게 하는 trpB; 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 활용할 수 있게 하는 hisD(Hartman & Mulligan, *Proc Natl Acad Sci. USA* (1988) 85:8047); 및 오르니틴 탈탄산효소 저해제인 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DFMO에 대한 저항성을 부여하는 ODC(오르니틴 탈탄산효소)(McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987))가 기술되었다.

[0120] ASM 효소를 발현하기 위해 사용될 수 있는 대안적인 진핵 발현 시스템은 ASM 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; ASM 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 또는 ASM 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템이다.

[0121] 효모에서, 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 검토를 위해, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13]; 문헌[Grant et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3]; 및 문헌[Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684]; 및 문헌[The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II]을 참조한다. 효모에서의 상보성 검정을 위해, ASM에 대한 cDNA는 효모 2μ 서클(circle)의 존재로 인해 효모에서 자율적으로 복제되는 효모 에피솜 플라스미드(YEP) 내로 클로닝될 수 있다. cDNA는 ADH 또는 LEU2와 같은 구성적 효모 프로모터 또는 GAL과 같은 유도성 프로모터 뒤에 클로닝될 수 있다(Cloning in Yeast, Chpt. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. D. M.

Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.). 작제물은 동족 ASM mRNA의 5' 및 3' 비번역 영역 또는 효모 유전자에 상응하는 것들을 함유할 수 있다. YEp 플라스미드는 높은 효율로 형질전환되고, 플라스미드는 극도로 안정적이다. 대안적으로, 효모 염색체 내로의 외래 DNA 서열의 통합을 촉진하는 벡터가 사용될 수 있다.

[0122] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, ASM 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터 중 임의의 것에 의해 구동될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 프로모터, 예컨대, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터(Brisson et al., *Nature* (1984) 310:511-514), 또는 TMV의 외피 단백질 프로모터(Takamatsu et al., *EMBO J.* (1987) 6:307-311)가 사용될 수 있으며; 대안적으로, RUBISCO의 작은 서브유닛과 같은 식물 프로모터(Coruzzi et al., *EMBO J.* (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., *Science* (1984) 224:838-843); 또는 열 충격 프로모터, 예를 들어, 대두 hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B(Gurley et al., *Mol Cell Biol.* (1986) 6:559-565)가 사용될 수 있다. 이들 작제물은 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터; 직접적인 DNA 형질전환; 미세주입, 전기천공 등을 사용하여 식물 세포 내로 도입될 수 있다. 이러한 기법에 대한 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463]; 및 문헌[Grierson & Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9]을 참조한다.

[0123] ASM을 발현하기 위해 사용될 수 있는 대안적인 발현 시스템은 곤충 시스템이다. 하나의 이러한 시스템에서, 아우토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) 핵 다면체 바이러스(AcNPV)가 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. ASM 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자) 내로 클로닝되고 AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 놓일 수 있다. 코딩 서열의 성공적인 삽입은 폴리헤드린 유전자의 비활성화 및 비-폐색형 재조합 바이러스(즉, 폴리헤드린 유전자에 의해 코딩된 단백질성 외피가 결여된 바이러스)의 생산을 초래할 것이다. 그런 다음, 이들 재조합 바이러스를 사용하여, 삽입된 유전자가 발현되는 스포도프테라 프루기페르다 세포를 감염시킨다(예를 들어, 문헌[Smith et al., *J Viol.* (1983) 46:584]; Smith, 미국 특허 제4,215,051호 참조).

[0124] *rASM 비활성 및 아이소폼의 정제 및 조절 방법*

[0125] 본 개시내용은 정제 프로세스를 변화시킴으로써 rASM(예를 들어, rhASM)의 비활성을 조절할 수 있고, rASM을 포함하는 조성물에서 rASM 아이소폼의 비를 조절할 수 있다는 예상치 못한 발견을 제공한다. 이러한 혁신은 rASM의 배치의 비활성을 표적 범위로 조정하는 데 사용될 수 있다. 비활성을 조정하는 이러한 방법은 다른 잠재적인 방법(예를 들어, 세포 배양 프로세스에 대한 변화)에 비해 프로세스 성능에 유의한 영향을 미치지 않으면서 구현하기에 더 간단할 수 있다.

[0126] 따라서, 다음의 방법이 본 개시내용에 제공된다:

[0127] I. 단백질 혼합물로부터 rASM을 정제하는 방법. 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 rASM 및 적어도 다른 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 혼합물은 rASM 및 숙주 세포 단백질, 예컨대 CHO 세포 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 rASM 및 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 단백질 혼합물을 본원에 기술된 바와 같은 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 본원에 기술된 바와 같은 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 rASM 및 HCP를 포함하는 단백질 혼합물을 개별적으로 처리하든 동시에 처리하든 관계없이, CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. CEX 및 IMAC의 서열은 스위칭 가능하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) rASM 및 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 단백질 혼합물을 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 본원에 기술된 바와 같은 IMAC로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "직접적으로"는 CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액이 다른 단계를 통해 프로세싱되지 않고 직접적으로 IMAC로 처리됨을 의미하는 반면, 용어 "간접적으로"는 CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액이 IMAC로 처리되기 전에 하나 이상의 추가적인 단계를 통해 프로세싱됨을 의미한다. 예를 들어, CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액은 IMAC로 처리되기 전에 다른 정제 단계(예를 들어, 다른 정제 컬럼)를 거친다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 선택적으로, CEX 크로마토그래피 및 IMAC의 서열은 교환될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) rASM 및 HCP를 포

함하는 단백질 혼합물을 본원에 기술된 바와 같은 IMAC로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) IMAC로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "직접적으로"는 IMAC로부터 수득된 용출액이 다른 단계를 통해 프로세싱되지 않고 직접적으로 CEX 크로마토그래피로 처리됨을 의미하는 반면, 용어 "간접적으로"는 IMAC로부터 수득된 용출액이 CEX 크로마토그래피로 처리되기 전에 하나 이상의 추가적인 단계를 통해 프로세싱됨을 의미한다. 예를 들어, IMAC로부터 수득된 용출액은 CEX 크로마토그래피로 처리되기 전에 다른 정제 단계(예를 들어, 다른 정제 컬럼)를 거친다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 정제된 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플로부터 불순물(예를 들어, HCP)을 제거하기 위해 샘플을 CEX 크로마토그래피 및/또는 IMAC로 처리하기 전 및/또는 처리한 후에 하나 이상의 추가적인 정제 단계가 포함될 수 있다. 이러한 정제 단계는 미국 특허 제8,796,419호, 제9,481,706호, 제10,259,842호, 및 PCT 공보 제WO 2008/085988 A1호 및 제WO 2019/121846 A1호에 논의되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0128] II. 초기 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 조성물에서 rASM의 아이소폼의 상대적 양을 조절하는 방법. 조성물 내의 rASM 아이소폼의 상대적 양은 모든 rASM 아이소폼이 조합될 때 총 rASM 풍부도와 비교하여 아이소폼의 정규화된 풍부도의 백분율과 동일하다. 예를 들어, 조성물 내의 비변형된 rASM의 정규화된 풍부도가 900만인 한편, 함께 조합된 조성물 내의 모든 rASM 아이소폼의 총 rASM 풍부도가 1000만인 경우, 조성물 내의 비변형된 rASM의 상대적 양은 90%이다. 초기 rASM 조성물은 비변형된 rASM 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 초기 rASM 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 초기 rASM 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 초기 rASM 조성물을 개별적으로 처리하든 동시에 처리하든 관계없이, CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. CEX 및 IMAC의 서열은 스위칭 가능하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) rASM을 포함하는 초기 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 IMAC로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 선택적으로, CEX 크로마토그래피 및 IMAC의 서열은 교환될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) rASM을 포함하는 초기 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 IMAC로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) IMAC로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 CEX 크로마토그래피로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 상대적 양의 rASM 아이소폼을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 조성물에서 비변형된 rASM 아이소폼의 상대적 양을 증가시키는 반면, 본원에 기술된 바와 같이 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 변형된 rASM 아이소폼의 적어도 하나의 상대적 양을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 초기 rASM 조성물에서의 비변형된 rASM 아이소폼과 비교할 때, 수득된 조성물에서의 비변형된 rASM 아이소폼의 상대적 양은 적어도 0.1%, 적어도 0.2%, 적어도 0.3%, 적어도 0.4%, 적어도 0.5%, 적어도 0.6%, 적어도 0.7%, 적어도 0.8%, 적어도 0.9%, 적어도 1.0%, 적어도 1.1%, 적어도 1.2%, 적어도 1.3%, 적어도 1.4%, 적어도 1.5%, 적어도 1.6%, 적어도 1.7%, 적어도 1.8%, 적어도 1.9%, 적어도 2.0%, 적어도 2.1%, 적어도 2.2%, 적어도 2.3%, 적어도 2.4%, 적어도 2.5%, 적어도 2.6%, 적어도 2.7%, 적어도 2.8%, 적어도 2.9%, 적어도 3.0%, 적어도 3.1%, 적어도 3.2%, 적어도 3.3%, 적어도 3.4%, 적어도 3.5%, 적어도 3.6%, 적어도 3.7%, 적어도 3.8%, 적어도 3.9%, 적어도 4.0%, 적어도 4.1%, 적어도 4.2%, 적어도 4.3%, 적어도 4.4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 또는 그 초과만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 변형된 rASM 아이소폼의 상대적 양은 적어도 5%, 적어도 10%, 15%, 적어도 20%, 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적

어도 90%, 또는 그 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 수득된 조성물에서 비변형된 rASM 아이소폼의 상대적 양은 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 또는 그 초과이다.

[0129] III. 비변형된 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM) 아이소폼, 및 C-말단 시스테인화, S-글루타티오닐화, 이합체화 및 절단으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 적어도 하나의 rASM 아이소폼을 포함하는 액체 조성물에서 rASM 비활성을 조절하는 방법. 일부 구현예에서, 방법은 액체 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 액체 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 초기 rASM 조성물을 개별적으로 처리하든 동시에 처리하든 관계없이, CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두로 처리하는 단계를 포함한다. CEX 및 IMAC의 서열은 스위칭 가능하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) 액체 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 IMAC로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC로부터 용출액을 수집하여, 추가로 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 선택적으로, CEX 크로마토그래피 및 IMAC의 서열은 교환될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 방법은 (i) 액체 조성물을 본원에 기술된 바와 같은 IMAC로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 (ii) IMAC로부터 용출액을 수집하여, 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 IMAC로부터 수득된 용출액을 직접적으로 또는 간접적으로 CEX 크로마토그래피로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CEX 크로마토그래피로부터 용출액을 수집하여, 추가로 조절된 비활성을 갖는 rASM 제제를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 수득된 rASM 제제는 감소된 비활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제에서의 비활성은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제에서의 비활성은 약 5 내지 50 U/mg, 예컨대, 약 10 내지 40 U/mg, 약 15 내지 45 U/mg, 약 10 내지 30 U/mg, 약 15 내지 35 U/mg, 또는 약 10 내지 20 U/mg이다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제에서의 비활성은 약 5 U/mg, 약 10 U/mg, 약 15 U/mg, 약 20 U/mg, 약 25 U/mg, 약 30 U/mg, 약 35 U/mg, 약 40 U/mg, 약 45 U/mg, 약 50 U/mg이다.

[0130] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 rASM은 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 예를 들어, rASM을 발현하는 숙주 세포 및/또는 rASM을 포함하는 세포 배양물을 수집하여 수확물을 생산한다. 본원에 기술된 방법에서, 수확된 세포 및/또는 세포 배양물은 있는 그대로, 적절하게, 또는 농축하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 수확물은 농축된다. 일부 구현예에서, 수확물은 정제되기 전에 적합한 방법(예를 들어, 여과)에 의해 정화되어, 정화된 수확물을 생산한다. 일부 구현예에서, 수확물은 용해되어, 용해물을 생산한다.

[0131] 일부 구현예에서, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피는 숙주 세포 단백질을 감소시키고/감소시키거나, 바이러스 제거율을 제공하기 위한 프로세스에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CEX", "양이온 교환 매질", "양이온 교환 수지" 및 "양이온 교환 재료"는 음으로 하전되어, 고체상 위를 지나가거나 이를 통과하는 수용액 내의 양이온과의 교환을 위한 유리 양이온을 갖는 고체상을 지칭한다. 양이온 교환 수지를 형성하기 위해 고체상에 부착된 음으로 하전된 리간드는, 예를 들어 카복실레이트 또는 설포네이트일 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 양이온 교환 수지는 카복시-메틸-셀룰로스, 아가로스 상에 고정화된 설포프로필(SP)(예를 들어, Pharmacia로부터의 SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ 또는 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™) 및 아가로스 상에 고정화된 설포닐(예를 들어, Pharmacia로부터의 S-SEPHAROSE FAST FLOW™)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)로 이루어진 군으로부터 선택된 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 (1) rASM을 포함하는 액체 조성물을 CEX 크로마토그래피 막 또는 컬럼에 로딩하는 것; (2) CEX 크로마토그래피 막

또는 컬럼을 세척 완충액으로 세척하는 것; (3) 용출 완충액으로 CEX 크로마토그래피 막 또는 컬럼으로부터 rASM을 용출하는 것; 및 (4) rASM을 포함하는 용출액을 수집하는 것을 포함한다. 용어 "평형 완충액"은 샘플을 크로마토그래피에 로딩하기 전에 크로마토그래피 수지를 평형화하기 위해 사용된 완충액을 지칭한다. 용어 "세척 완충액"은 샘플이 크로마토그래피 상에 로딩된 후에 크로마토그래피 수지를 세척하기 위해 사용된 완충액을 지칭한다. 일부 구현예에서, 세척 완충액 및 평형 완충액은 동일하거나 상이하다. 일부 경우에, 세척 완충액 및 로딩 완충액은 동일할 수 있다. 크로마토그래피 매질을 "세척"하는 것은 샘플을 크로마토그래피 매질에 로딩한 후에 적절한 완충액이 매질을 통과하게 하거나 그 위로 지나가게 하는 것을 포괄하는 것을 의도한다. "용출 완충액"은 고체상으로부터 표적 단백질을 용출하기 위해 사용된다. 용출 완충액의 전도도 및/또는 pH는 통상적으로 표적 단백질이 크로마토그래피 수지로부터 용출되도록 하는 것이다. 크로마토그래피 수지로부터 분자(예를 들어, 관심 폴리펩티드 또는 불순물)를 "용출"하는 것은, 완충액이 크로마토그래피 수지에 대한 결합을 위해 관심 분자와 경쟁하도록, 또는 관심 분자와 수지 사이의 결합 상호작용이 약화되어 관심 분자가 해리되도록 용액 조건을 변경함으로써 그로부터 분자를 제거하는 것을 의도한다. 비제한적인 예는 완충액이 이온 교환 재료 상의 하전된 부위에 대해 분자와 경쟁하도록 이온 교환 재료를 둘러싸는 완충액의 이온 강도를 변경함으로써 이온 교환 수지로부터 분자를 용출시키는 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "용출액"은 용출을 통해 수득된 관심 분자를 함유하는 용액뿐만 아니라 통과액 정제의 결과로서 수득된 관심 표적 단백질을 함유하는 통과액 분획을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "용출액"은 결합 및 용출 크로마토그래피 단계로부터의 용출 풀을 지칭한다.

[0132] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 (1) rASM을 포함하는 조성물을 CEX 크로마토그래피 막 또는 CEX 크로마토그래피 컬럼에 로딩하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 비변형된 rASM 아이소폼 및 적어도 하나의 변형된 rASM 아이소폼을 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 (2) 막 또는 컬럼을 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도를 갖는 세척 완충액으로 세척하는 것을 추가로 포함한다. 제1 최적 pH 및 제1 최적 염 농도는 수지 및 조성물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다. 일부 구현예에서, 세척 완충액은 인산나트륨과 같은, 포스페이트 염에 기반한 pH 완충 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 약 5 내지 100 mM, 예컨대, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM이다.

[0134] 일부 구현예에서, 세척 완충액은 최적 염 농도로 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 염은 염화나트륨이다. 일부 구현예에서, 염화나트륨 농도는 약 5 내지 100 mM, 예컨대, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM이다.

[0135] 일부 구현예에서, 제1 최적 염 농도 및 제1 최적 pH는 하기 표 2a의 조건으로부터 선택된다.

[0136] [표 2a]

[0137] CEX 세척 완충액에 대한 염(NaCl)/pH 조건

	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 mM	CEX W5	CEX W30	CEX W55	CEX W80	CEX W105	CEX W130	CEX W155	CEX W180	CEX W205	CEX 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

[0138]

	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
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]

[0140] 일반적으로 말하면, 세척 완충액에서의 더 높은 pH 및/또는 더 높은 염 농도는 더 높은 순도(예를 들어, 더 높은 HCP 제거율)를 야기하지만, 더 낮은 비활성 및 더 낮은 회수율을 야기한다. 따라서, CEX 세척 조건은 표적

순도 및 비활성에 따라 CEX W1 내지 CEX W250으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 조건은 CEX W1 내지 CEX W25로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W26 내지 CEX W50으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W51 내지 CEX W75로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W76 내지 CEX W100으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W101 내지 CEX W125로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W126 내지 CEX W150으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W151 내지 CEX W175로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W176 내지 CEX W200으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W201 내지 CEX W225로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX W226 내지 CEX W250으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX W115로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 CEX W66, CEX W91, CEX 116, CEX W67, CEX W92, CEX W117, CEX W68, CEX W93, CEX W118, CEX W69, CEX W94, CEX W119, CEX W70, CEX W95, 및 CEX W120으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX W195로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX W190으로부터 선택된다.

[0141] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 (3) 막 또는 컬럼을 제2 최적 pH 및 제2 최적 염 농도를 갖는 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 최적 pH는 세척 완충액에 사용된 제1 최적 pH와 동일하거나 그에 가깝다. 일부 구현예에서, 제2 최적 염 농도는 세척 완충액 내의 제1 최적 염 농도에 따라 사전결정된다. 일반적으로, 제1 최적 염 농도보다 더 높은 염 농도를 사용하여 막 또는 컬럼에 대한 rASM 결합을 용출한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액 내의 염 농도는 약 150 mM, 약 160 mM, 약 170 mM, 약 180 mM, 약 190 mM, 약 200 mM, 약 210 mM, 약 220 mM, 약 230 mM, 약 240 mM, 또는 약 250 mM이다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 인산나트륨과 같은, 포스페이트 염에 기반한 pH 완충 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 약 5 내지 100 mM, 예컨대, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM이다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 CEX 세척 완충액에서의 농도와 동일하거나 유사하다.

[0142] 일부 구현예에서, 용출 완충액은 최적 염 농도로 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 염은 염화나트륨이다.

[0143] 일부 구현예에서, 용출 완충액의 제2 최적 염 농도 및 제2 최적 pH는 하기 표 2b의 조건으로부터 선택된다.

[0144] [표 2b]

[0145] **CEX 용출 완충액에 대한 염(NaCl)/pH 조건**

[0146]

	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

	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
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
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

[0147]

[0148] 일부 구현예에서, 조건은 CEX E1 내지 CEX E25로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E26 내지 CEX E50으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E51 내지 CEX E75로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E76 내지 CEX E100으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E101 내지 CEX E125로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E126 내지 CEX E150으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E151 내지 CEX E175로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E176 내지 CEX E200으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E201 내지 CEX E225로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 CEX E226 내지 CEX E250으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX E115로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 CEX E66, CEX E91, CEX 116, CEX E67, CEX E92, CEX E117, CEX E68, CEX E93, CEX E118, CEX E69, CEX E94, CEX E119, CEX E70, CEX E95, 및 CEX E120으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX E195로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 CEX E190으로부터 선택된다.

[0149] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피는 다음의 세척/용출 조건 조합 중 임의의 하나를 포함한다:

[0150] (1) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0151] (2) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0152] (3) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0153] (4) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0154] (5) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0155] (6) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0156] (7) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0157] (8) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0158] (9) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건.

[0159] 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피 단계는 냉장 조건(예를 들어, 8 ± 3℃) 하에서 또는 주변 온도 하에서 수행될 수 있다.

[0160] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법은 숙주 세포 단백질을 감소시키기 위한 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "IMAC"는 수용액 내의 히스티딘 또는 시스테인에 대한 Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} 및 Co^{2+}와 같은 전이 금속 이온의 친화성에 기반한 고체상을 지칭한다. IMAC의 유형은 문헌 [Block et al., *Methods in Enzymology* (2009) 463:439-73]에 기술되어 있다. 추가 구현예에서, IMAC 수지는 이가 이온으로 채워진다. 또 다른 추가 구현예에서, 이가 금속 이온은 니켈, 구리, 코발트 또는 아연이다. 보다 구체적인 구현예에서, 이가 금속 이온은 아연이다.

[0161] 일부 구현예에서, IMAC 크로마토그래피는 (1) rASM을 포함하는 액체 조성물을 IMAC 크로마토그래피 막 또는 컬럼에 로딩하는 것; (2) IMAC 크로마토그래피 막 또는 컬럼을 세척 완충액으로 세척하는 것; (3) 용출 완충액으로 IMAC 크로마토그래피 막 또는 컬럼으로부터 rASM을 용출하는 것; 및 (4) rASM을 포함하는 용출액을 수집하는 것을 포함한다.

[0162] 일부 구현예에서, CEX 크로마토그래피에서 수득된 용출액은 결합-및-용출 모드에서 IMAC 크로마토그래피로 처리된다.

[0163] 일부 구현예에서, IMAC는 (1) rASM을 포함하는 조성물을 IMAC 크로마토그래피 막 또는 IMAC 크로마토그래피 컬럼에 로딩하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 비변형된 rASM 아이소폼 및 적어도 하나의 변형된 rASM 아이소폼을 포함한다.

[0164] 일부 구현예에서, IMAC 크로마토그래피는 (2) 막 또는 컬럼을 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도를 갖는 세척 완충액으로 세척하는 것을 추가로 포함한다. 제3 최적 pH 및 제3 최적 염 농도는 수지 및 조성물의 초기 비활성에 따라 사전결정된다. 일부 구현예에서, 세척 완충액은 인산나트륨과 같은, 포스페이트 염에 기반한 pH 완충 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 약 1 내지 100 mM, 예컨대, 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 8 mM, 약 9 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM이다. 일부 구현예에서, 제3 최적 염 농도 및 제3 최적 pH는 하기 표 3의 조건으로부터 선택된다.

[0165] [표 3]

[0166] IMAC 세척 완충액에 대한 염(NaCl)/pH 조건

	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 mM	IMAC W5	IMAC W30	IMAC W55	IMAC W80	IMAC W105	IMAC W130	IMAC W155	IMAC W180	IMAC W205	IMAC 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

[0167]

	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
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

[0168]

[0169] 일반적으로 말하면, IMAC 세척 완충액에서의 더 낮은 pH 및/또는 더 높은 염 농도는 더 높은 순도(예를 들어, 더 높은 HCP 제거율)를 야기하지만, 더 낮은 비활성 및 더 낮은 회수율을 야기한다. 따라서, IMAC 세척 조건은 표적 순도 및 비활성에 따라 IMAC W1 내지 IMAC W250으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W1 내지 IMAC W25로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W26 내지 IMAC W50으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W51 내지 IMAC W75로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W76 내지 IMAC W100으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W101 내지 IMAC W125로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W126 내지 IMAC W150으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W151 내지 IMAC W175로부

터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W176 내지 IMAC W200으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W201 내지 IMAC W225로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC W226 내지 IMAC W250으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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 W105로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC W230으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC W110으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC W235로부터 선택된다.

[0170] 선택적으로, IMAC 크로마토그래피는 추가 세척 단계(IMAC 세척 2)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 제1 IMAC 세척 단계에 사용된 것보다 더 낮은 pH를 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 제1 IMAC 세척 단계에 사용된 것보다 약 0.1, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 또는 약 1.2 더 낮은 pH를 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 제1 IMAC 세척 단계에 사용된 것과 동일하거나 그에 가까운 염 조건을 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 제1 세척보다 더 높은 염 농도(예를 들어, NaCl)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 적어도 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, 또는 그 초과의 염화나트륨 농도를 포함한다.

[0171] 일부 구현예에서, 제2 세척 단계는 제1 IMAC 세척 단계에 사용된 것과 동일하거나 그에 가까운 염 농도를 갖는 세척 완충액을 사용하는 것을 포함한다.

[0172] 일부 구현예에서, IMAC 크로마토그래피는 (3) 막 또는 컬럼을 제4 최적 pH 및 제4 최적 염 농도를 갖는 용출 완충액으로 용출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 인산나트륨과 같은, 포스페이트 염에 기반한 pH 완충 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 약 5 내지 100 mM, 예컨대, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM이다. 일부 구현예에서, 인산나트륨 농도는 IMAC 세척 완충액에서의 농도와 동일하거나 유사하다. 일부 구현예에서, 제4 최적 염 농도 및 제4 최적 pH는 IMAC 세척 완충액에서의 제3 최적 염 농도 및 제3 최적 pH에 따라 사전결정된다.

[0173] 일부 구현예에서, 제4 최적 염 농도 및 제4 최적 pH는 하기 표 4의 조건으로부터 선택된다.

[0174] [표 4]

[0175] IMAC 용출 완충액에 대한 염(NaCl)/pH 조건

	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 E15	IMAC E40	IMAC E65	IMAC E90	IMAC E115	IMAC E140	IMAC E165	IMAC E190	IMAC E215	IMAC 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

[0176]

	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
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

[0177]

[0178] IMAC 용출 조건은 표적 순도 및 비활성에 따라 IMAC E1 내지 IMAC E250으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E1 내지 IMAC E25로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E26 내지 IMAC E50으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E51 내지 IMAC E75로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E76 내지 IMAC E100으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E101 내지 IMAC E125로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E126 내지 IMAC E150으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E151 내지 IMAC E175로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E176 내지 IMAC E200으로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E201 내지 IMAC E225로부터 선택되고; 일부 구현예에서, 조건은 IMAC E226 내지 IMAC E250

으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC E118로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC E242로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC E123으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조건은 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, 및 IMAC E247로부터 선택된다.

[0179] 일부 구현예에서, IMAC는 다음의 세척/용출 조건 조합 중 임의의 하나를 포함한다:

[0180] (1) IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0181] (2) IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0182] (3) IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0183] (4) IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0184] (5) IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0185] (6) IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0186] (7) IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0187] (8) IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0188] (9) IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0189] 본원에 기술된 바와 같은 IMAC 단계는 냉장 조건(예를 들어, 8 ± 3℃) 하에서 또는 주변 온도 하에서 수행될 수 있다.

[0190] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 방법은 CEX 크로마토그래피 및 IMAC의 순서와 관계없이, 동시에 또는 개별적으로 CEX 크로마토그래피 및 IMAC 둘 모두를 포함하고, 여기서 방법은 다음의 세척/용출 조건 중 임의의 하나를 포함한다:

[0191] (1) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0192] (2) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0193] (3) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX

용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0194] (4) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0195] (5) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0196] (6) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0197] (7) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0198] (8) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0199] (9) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0200] (10) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건;

[0201] (11) IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0202] (12) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0203] (13) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0204] (14) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0205] (15) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0206] (16) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0207] (17) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0208] (18) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의

CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0209] (19) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0210] (20) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0211] (21) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0212] (22) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0213] (23) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0214] (24) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0215] (25) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0216] (26) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0217] (27) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0218] (28) CEX W1 내지 CEX W25 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0219] (29) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0220] (30) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0221] (31) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0222] (32) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0223] (33) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0224] (34) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0225] (35) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0226] (36) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0227] (37) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0228] (38) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0229] (39) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0230] (40) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0231] (41) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0232] (42) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0233] (43) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0234] (44) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0235] (45) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0236] (46) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0237] (47) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중

임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0238] (48) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0239] (49) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0240] (50) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0241] (51) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0242] (52) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0243] (53) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0244] (54) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0245] (55) CEX W101 내지 CEX W125 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0246] (56) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0247] (57) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0248] (58) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0249] (59) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0250] (60) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0251] (61) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0252] (62) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의

CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0253] (63) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0254] (64) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E1 내지 CEX E25 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0255] (65) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0256] (66) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0257] (67) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0258] (68) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0259] (69) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0260] (70) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0261] (71) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0262] (72) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0263] (73) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E101 내지 CEX E125 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0264] (74) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0265] (75) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0266] (76) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W1 내지 IMAC W25 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0267] (77) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0268] (78) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0269] (79) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W76 내지 IMAC W100 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0270] (80) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E51 내지 IMAC E75 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0271] (81) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E126 내지 IMAC E150 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건;

[0272] (82) CEX W226 내지 CEX W250 중 임의의 하나의 CEX 세척 조건, 및 CEX E226 내지 CEX E250 중 임의의 하나의 CEX 용출 조건; IMAC W176 내지 IMAC W200 중 임의의 하나의 IMAC 세척 조건, 및 IMAC E226 내지 IMAC E250 중 임의의 하나의 IMAC 용출 조건.

[0273] *재조합 산성 스핑고미엘리나제 조성물*

[0274] 본 개시내용은 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM)를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, rASM은 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)이다. 일부 구현예에서, rhASM은 올리푸다제 알파이다. 일부 구현예에서, rhASM은 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, rhASM은 SEQ ID NO: 1 내지 6 중 임의의 하나 또는 이의 혼합물과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0275] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조성물은 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기술된 방법에 따라 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 액체 제형이다. 일부 구현예에서, 조성물은 동결건조된 제형이다.

[0276] 일부 구현예에서, 조성물은 rhASM 제제와 같은 rASM 제제이다. 일부 구현예에서, 제제는 치료적 용도 또는 상업적 판매를 위해 준비된 최종 생성물이다. 일부 구현예에서, 제제는 다운스트림 제조를 위한 중간 생성물이다.

[0277] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 조성물을 함유하는 용기(예를 들어, 바이알)를 제공한다.

[0278] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 조성물은 rhASM을 함유하고, 잘 제어되는 비활성을 가지면서 우수한 rhASM 아이소폼 균일성 및 순도를 나타낸다.

[0279] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 rASM 조성물은 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95.0%, 적어도 95.5%, 적어도 96.0%, 적어도 96.5%, 적어도 97.0%, 적어도 97.5%, 적어도 98.0%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 그 초과의 순도를 갖는다. 본 개시내용의 조성물의 순도는 당업계에 알려진 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 순도는 RP-HPLC와 같은 HPLC에 의해 결정된다.

[0280] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 rASM 조성물은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과인 비변형된 rASM 아이소폼을 갖는다. 일부 구현예에서, rASM 조성물 내의 비변형된 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적

어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 초과이다. 일부 구현예에서, 모든 변형된 rASM 아이소폼은 통틀어 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 50% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만이다.

[0281] 일부 구현예에서, C-말단 시스테인화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 50% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만이다.

[0282] 일부 구현예에서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 50% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하이다. 일부 구현예에서, C-말단 S-글루타티오닐화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 그 미만이다.

[0283] 일부 구현예에서, C-말단 이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하, 또는 0.2% 이하이다. 일부 구현예에서, C-말단 이합체화를 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 0.1% 이하이다. C-말단 이합체화를 갖는 아이소폼은 표 1에 기술된 것들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0284] 일부 구현예에서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 50% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하이다. 일부 구현예에서, C-말단 절단을 갖는 rASM 아이소폼은 rASM 제제 내의 총 rASM 집단 중 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 또는 그 미만이다. C-말단 절단을 갖는 아이소폼은 표 1에 기술된 것들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0285] rASM 조성물의 비활성은 약 5 U/mg, 약 6 U/mg, 약 7 U/mg, 약 8 U/mg, 약 9 U/mg, 약 10 U/mg, 약 11 U/mg, 약 12 U/mg, 약 13 U/mg, 약 14 U/mg, 약 15 U/mg, 약 16 U/mg, 약 17 U/mg, 약 18 U/mg, 약 19 U/mg, 약 20 U/mg, 약 21 U/mg, 약 22 U/mg, 약 23 U/mg, 약 24 U/mg, 약 25 U/mg, 약 26 U/mg, 약 27 U/mg, 약 28 U/mg, 약 29 U/mg, 약 30 U/mg, 약 31 U/mg, 약 32 U/mg, 약 33 U/mg, 약 34 U/mg, 약 35 U/mg, 약 36 U/mg, 약 37 U/mg, 약 38 U/mg, 약 39 U/mg, 약 40 U/mg, 약 41 U/mg, 약 42 U/mg, 약 43 U/mg, 약 44 U/mg, 약 45 U/mg, 약 46 U/mg, 약 47 U/mg, 약 48 U/mg, 약 49 U/mg, 또는 약 50 U/mg이다. 일부 구현예에서, 비활성은 약 5 내지 50 U/mg이다. 일부 구현예에서, 비활성은 약 10 내지 40 U/mg이다. 일부 구현예에서, 비활성은 약 10 내지 30 U/mg이다. 일부 구현예에서, 비활성은 약 10 내지 20 U/mg이다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제에서의 비활성은 약 5 내지 50 U/mg, 예컨대, 약 10 내지 40 U/mg, 약 15 내지 45 U/mg, 약 10 내지 30 U/mg, 약 15 내지 35 U/mg, 또는 약 10 내지 20 U/mg이다. 일부 구현예에서, 수득된 rASM 제제에서의 비활성은 약 5 U/mg, 약 10 U/mg, 약 15 U/mg, 약 20 U/mg, 약 25 U/mg, 약 30 U/mg, 약 35 U/mg, 약 40 U/mg, 약 45 U/mg, 또는 약 50 U/mg이다. rASM 조성물의 비활성은 당업계에 알려진 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, rASM 조성물의 비활성은 실시예 4에 기술된 바와 같은 검정에 의해 결정된다.

[0286] 본원에 기술된 바와 같은 재조합 ASM 조성물은 5.0 μg/mg 이하의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 갖는다. 일부 구현예에서, rASM 조성물은 5.0 μg/mg 이하, 4.5 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 3.5 μg/mg 이하, 3.0 μg/mg 이하, 2.5 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 1.5 μg/mg 이하, 1.0 μg/mg 이하, 0.9 μg/mg 이하, 0.8 μg/mg 이하, 0.7 μg/mg 이하, 0.6 μg/mg 이하, 0.5 μg/mg 이하, 또는 그 미만의 HCP 수준을 갖는다.

[0287] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 rASM 조성물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1 개, 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 적어도 5 개, 적어도 6 개, 적어도 7 개, 또는 적어도 8 개의 특성을 가질 수 있다:

[0288] (1) 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%,

적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95.0%, 적어도 95.5%, 적어도 96.0%, 적어도 96.5%, 적어도 97.0%, 적어도 97.5%, 적어도 98.0%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 그 초과의 순도를 가짐;

[0289] (2) 총 rASM 집단 중 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 초과인 rASM 조성물 내의 비변형된 rASM 아이소폼을 가짐;

[0290] (3) 총 rASM 집단 중 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하 또는 그 미만인 C-말단 시스테인화를 포함하는 rASM 아이소폼을 가짐;

[0291] (4) 총 rASM 집단 중 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 그 미만인 C-말단 S-글루타티오닐화를 포함하는 rASM 아이소폼을 가짐;

[0292] (5) 총 rASM 집단 중 2% 이하, 1.9% 이하, 1.8% 이하, 1.7% 이하, 1.6% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 1.0% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하, 0.2% 이하, 또는 0.1% 이하인 C-말단 이합체화를 포함하는 rASM 아이소폼을 가짐;

[0293] (6) 총 rASM 집단에 비해 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하 또는 그 미만인 C-말단 절단을 포함하는 rASM 아이소폼을 가짐;

[0294] (7) 약 10 내지 50 U/mg, 약 15 내지 35 U/mg, 약 10 내지 30 U/mg, 또는 약 10 내지 20 U/mg인 비활성을 가짐; 그리고

[0295] (8) 5.0 μg/mg 이하, 4.5 μg/mg 이하, 4.0 μg/mg 이하, 3.5 μg/mg 이하, 2.0 μg/mg 이하, 1.5 μg/mg 이하, 1.0 μg/mg 이하, 0.5 μg/mg 이하, 또는 그 미만의 숙주 세포 단백질(HCP) 수준을 가짐.

[0296] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 재조합 산성 스핑고미엘리나제(rASM)를 포함하는 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 숙주 세포에서 발현된 rASM을 정제함으로써 생산된다. 특히, 본원에 기술된 바와 같은 rASM을 포함하는 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 정제 방법을 포함하는 프로세스를 통해 생산된다. 추가 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 rASM을 포함하는 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피를 사용하여 정제된다. 추가 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 rASM을 포함하는 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 CEX 크로마토그래피 및/또는 IMAC를 사용하여 정제된다.

[0297] *정제된 rhASM을 포함하는 제형화된 약제학적 조성물*

[0298] 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 정제된 rASM(예를 들어, rhASM)을 포함하는 약제학적 조성물도 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 rASM 제제를 제형화함으로써 제조된다. 일부 구현예에서, 제형화 프로세스는 rASM 제제 내의 rASM의 비활성 및/또는 제제 내의 rASM 아이소폼의 관련 비를 변화시키지 않거나, 유의하게 변화시키지 않는다. 예를 들어, 제형화 프로세스 후, 조성물 내의 rASM의 비활성은 제형화 프로세스 전의 비활성과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 1x, 적어도 2x, 적어도 3x, 적어도 4x, 적어도 5x, 적어도 6x, 적어도 7x, 적어도 8x, 적어도 9x, 적어도 10x, 적어도 15x, 적어도 20x, 적어도 30x, 적어도 40x, 적어도 50x 또는 그 초과이다.

[0299] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유한다. "부형제"는 약물의 활성 성분(들)을 위한 희석제, 비히클, 담체, 보존제, 결합제 또는 안정화제로서 사용되는 불활성 물질을 지칭한다. 예를 들어, 조성물은 완충제, 등장화제 및/또는 안정화제, 예컨대, 산화방지제를 함유할 수 있다. 일부 경우에는, 하나의 제제가 이들 목적 중 하나 초과에 도움이 될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 재조합 인간 ASM, 예컨대, 올리푸다제 알파, 완충제, 예컨대, 인산나트륨 또는 시트르산나트륨, 안정화제, 예컨대, L-메티오닌, 및 비환원당, 예컨대, 수크로스 또는 트레할로스를 함유한다. 인간 ASM은 조성물에서의 특정 구성으로 인해 개선된 안정성을 갖는다. 본 발명의 조성물은 수성 액체 용액 또는 동결건조된 제제일 수 있다.

[0300] 일부 구현예에서, 조성물은 1 내지 10 mg/mL(예를 들어, 3 내지 5 mg/mL) rhASM(예를 들어, 올리푸다제 알파); 10 내지 50 mM(예를 들어, 10 내지 30 mM) 인산나트륨; 70 내지 150 mM(예를 들어, 80 내지 120 mM) 메티오닌

(예를 들어, L-메티오닌); 및 1 내지 10%(예를 들어, 4 내지 6%) w/v 수크로스 또는 트레할로스를 포함하는 수성 액체 조성물이다. 수성 액체 조성물의 pH는 5 내지 8(예를 들어, 6 내지 7)일 수 있다.

[0301] 일부 구현예에서, 수성 액체 조성물은 가장 용이하게 사용되는 결정질 부형제인 만니톨을 검출 가능한 양으로 포함하지 않는데, 왜냐하면 이는 본원에 기술된 수성 액체 조성물의 동결건조 동안 또는 후에 인간 ASM의 응집을 유의하게 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0302] 일부 구현예에서, 수성 액체 조성물은 0.004 내지 0.008%, 0.005 내지 0.007%, 또는 0.005% w/v의 계면활성제(들)를 포함한다. 예시적인 계면활성제는 비이온성 세제, 예컨대, 폴리소르베이트(예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 80) 및 폴록사머(예를 들어, 폴록사머 188)를 포함한다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 0.005% 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 경우에, 계면활성제(들)가 존재하면, 액체 조성물에서 탁도를 감소시키는 것을 도울 수 있다.

[0303] 일부 구현예에서, 수성 액체 조성물은 0.05, 0.01, 또는 0.005 mM 이하의 킬레이팅제(들), 예컨대, EDTA 및 EGTA를 포함하며; 예시적인 구현예에서, 수성 액체 조성물은 검출 가능한 양의 킬레이팅제(들)를 포함하지 않는다. 일부 경우에, 킬레이팅제가 상기 농도 초과, 예를 들어, 0.05 mM 또는 0.1 mM로 존재하면, 특히 장기간의 저장 기간 후, 예를 들어, 12 내지 16 주 동안, 또는 비-냉장 조건 하에서, 예를 들어, 25℃에서, 인간 ASM의 응집을 증가시키고 그의 안정성을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 수성 액체 조성물은 0 내지 50 ppm(예를 들어, 15 내지 30 ppm)의 아연을 함유할 수 있으며, 이는 예를 들어, 제조 프로세스로부터 잔류하거나 외부에서 첨가될 수 있다.

[0304] 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 4 mg/mL 올리푸다제 알파, 20 mM 인산나트륨, 100 mM 메티오닌, 및 5%(w/v) 수크로스를 포함하거나 본질적으로 이로 이루어지고, 6.5의 pH를 갖는다. 용어 "본질적으로 ~로 이루어지다"는 조성물이 검출 가능한 양으로 다른 성분을 함유하지 않거나 단백질 제조 프로세스로부터 유래된 미량의 특정 재료만을 함유할 수 있으며, 여기서 이러한 재료는 효소의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않거나 인간 환자에게 해를 끼치지 않는 것을 의미한다.

[0305] 일부 구현예에서, 조성물은 1 내지 20 mg/mL(예를 들어, 10 mg/mL)의 rhASM(예를 들어, 올리푸다제 알파) 및 10 내지 50 mM(예를 들어, 20 mM)의 인산나트륨을 포함하는 수성 액체 조성물이다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 메티오닌(예를 들어, L-메티오닌) 및 수크로스 또는 트레할로스를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 80 내지 120 mM(예를 들어, 100 mM)의 메티오닌 및 4 내지 6%(예를 들어, 5%)(w/v)의 수크로스를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 6.5의 pH를 갖는다.

[0306] 일부 구현예에서, 조성물은 1 내지 50 mg/mL(예를 들어, 3.8, 18, 또는 49 mg/mL)의 rhASM(예를 들어, 올리푸다제 알파) 및 10 내지 50 mM(예를 들어, 20 mM)의 인산나트륨을 포함하는 수성 액체 조성물이다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 1 내지 15%(예를 들어, 5%, 6%, 7%, 또는 8%)의 수크로스 또는 트레할로스를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 80 내지 120 mM(예를 들어, 100 mM)의 메티오닌을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 수성 액체 조성물은 6.5의 pH를 갖는다. 조성물은, 예를 들어 3.8 mg/mL rhASM, 20 mM 인산나트륨, 및 5% 수크로스; 18 mg/mL rhASM, 20 mM 인산나트륨, 및 5% 수크로스; 또는 49 mg/mL rhASM, 20 mM 포스페이트, 및 8% 수크로스를 포함할 수 있다.

[0307] 수성 액체 조성물은 재조합 기술에 의해 생산되고 후속적으로 숙주 세포로부터 정제된 인간 ASM을 본원에 기술된 부형제와 물에서 혼합하고, 생성된 혼합물을 원하는 pH로 조정함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간 ASM 및 원하는 부형제는 원하는 인산나트륨 농도 및 pH를 갖는 인산나트륨 완충액에 첨가되거나, 인산나트륨 완충액으로 완충액-교환될 수 있다.

[0308] 일부 구현예에서, 수성 액체 조성물은 아래에서 상세히 추가로 기술되는 본 발명의 동결건조된 조성물을 재구성함으로써 제조될 수 있다. 재구성은 약제학적으로 허용되는 액체, 예컨대, 멸균수, 식염수(예를 들어, 0.9% 염화나트륨) 또는 인산염 완충 식염수를 이용하여 수행될 수 있다.

[0309] 본 발명은 동결건조된 조성물도 제공한다. 이러한 조성물은 본원에 기술된 수성 액체 조성물을 동결건조시킴으로써 제조될 수 있다. 동결건조된 조성물은 장기간의 저장에 적합하다. 동결건조는 당업계에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 액체 조성물을 동결을 가능하게 하는 영하(섭씨) 온도(예를 들어, -5℃ 내지 -80℃)까지 냉각시킨 다음, 승화가 일어날 수 있도록 저압(부분 진공) 챔버에 배치할 수 있고(일차 건조); 원하는 경우, 조성물의 온도를 건조의 제2 단계(이차 건조)에서 상승시켜 원치 않는 물 분자를 추가로 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 동결건조 프로세스의 완료 후, 용기를 밀봉하기 전에 질소와 같은 불활성 가스를 조성물

의 용기(예를 들어, 유리 바이알) 내로 도입할 수 있다.

[0310] 일부 구현예에서, 본 발명은, 예를 들어 본원에 기술된 수성 액체 조성물을 분무-건조시킴으로써 제조될 수 있는 분말화된 조성물을 제공한다. 분무-건조된 조성물은 장기간의 저장에 적합하다. 분무-건조는 당업계에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 액체 조성물을 아토마이저 또는 분무 노즐을 통해 강제로 주입하여, 이를 제어된 크기의 작은 액적으로서 챔버 내의 고온 가스 스트림 내로 분산시킴으로써, 액체 조성물을 분말로 신속하게 건조시킬 수 있다. 그런 다음, 건조된 분말을 건조 챔버의 바닥에서 수집할 수 있다. 분말화된 조성물을 제조하기 위한 다른 건조 방법도 고려된다.

[0311] 본원에 기술된 양으로 존재하는 수크로스(또는 트레할로스) 및 메티오닌은 동결건조 동안 우수한 결과를 제공하며; 동결건조된 생성물은 저장 동안 인간 ASM의 안정성을 보존하면서 정밀한(elegant) 케이크를 형성한다. 본 발명의 동결건조된 조성물에서의 인간 ASM은 냉장 조건 하에서(예를 들어, 0 내지 10℃, 2 내지 8℃, 또는 4℃에서) 적어도 4 개월(예를 들어, 적어도 6 개월 또는 적어도 12 개월) 동안 응집이 없고 생물학적으로 활성인 상태를 유지할 수 있다.

[0312] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 4 내지 50% 올리푸다제 알파, 3 내지 7% 인산나트륨, 및 45 내지 90% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함하는 동결건조된 약제학적 조성물이다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 5.5% 올리푸다제 알파, 20.6% L-메티오닌, 2.3% 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 2.6% 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 69.0% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함한다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 6.6% 올리푸다제 알파, 3.0% 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 3.3% 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 87.1% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함한다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 25.2% 올리푸다제 알파, 2.4% 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 2.6% 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 69.9% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함한다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 47.8% 올리푸다제 알파, 1.7% 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 1.8% 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 48.8% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함한다.

[0313] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 4 내지 7% 올리푸다제 알파, 15 내지 25% L-메티오닌, 3 내지 7% 인산나트륨, 및 65 내지 75% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함하는 동결건조된 약제학적 조성물이다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 5.5% 올리푸다제 알파, 20.5% L-메티오닌, 2.3% 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 2.6% 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 68.6% 수크로스(모두 w/w 백분율)를 포함한다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은, 예를 들어 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 또는 1.0% 수분도 포함할 수 있다.

[0314] 일부 구현예에서, 본 발명은 15 내지 25 mg의 올리푸다제 알파, 75 내지 85 mg의 L-메티오닌, 15 내지 25 mg의 인산나트륨, 및 250 내지 300 mg의 수크로스를 포함하는 동결건조된 약제학적 조성물을 함유하는 바이알을 제공한다. 사용 전에, 조성물은 4 내지 6 mL의 멸균수에 재구성될 수 있다.

[0315] 일부 구현예에서, 바이알은 21.2 mg, 20.1 mg, 95.4 mg, 또는 259.7 mg의 올리푸다제 알파; 9.0 mg의 인산나트륨 이염기성 칠수화물; 10.0 mg의 인산나트륨 일염기성 일수화물; 및 265 mg의 수크로스를 포함하거나 이로 이루어진 동결건조된 약제학적 조성물을 함유한다. 동결건조된 조성물은 79.1 mg의 L-메티오닌을 선택적으로 포함할 수 있다. 동결건조된 약제학적 조성물은 0 내지 0.3 mg(예를 들어, 0.08 내지 0.16 mg)의 아연을 선택적으로 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어 제조 프로세스로부터 잔류하거나 외부에서 첨가될 수 있다. 특정 구현예에서, 바이알은 내부적으로 멸균된 질소 충전 분위기를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 5.1 mL의 멸균수에 재구성되어, 각각 약 4.0 mg/mL, 3.8 mg/mL, 18 mg/mL, 또는 49 mg/mL의 올리푸다제 알파 농도를 산출할 수 있다. 재구성된 조성물은 투여될 용량에 기반하여 비체적까지 0.9% 염화나트륨 용액에 추가로 희석될 수 있다.

[0316] 특정 구현예에서, 바이알은 21.2 mg의 올리푸다제 알파, 79 mg의 L-메티오닌, 9.0 mg의 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 10.0 mg의 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 265 mg의 수크로스를 포함하거나 이로 이루어진 동결건조된 약제학적 조성물을 함유한다. 동결건조된 약제학적 조성물은 0 내지 0.3 mg(예를 들어, 0.08 내지 0.16 mg)의 아연을 선택적으로 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어 제조 프로세스로부터 잔류하거나 외부에서 첨가될 수 있다. 특정 구현예에서, 동결건조된 약제학적 조성물은 케이크 또는 동결건조된 분말의 형태이다. 특정 구현예에서, 바이알은 내부적으로 멸균된 질소 충전 분위기를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 5.1 mL의 멸균수에 재구성되어, 약 4.0 mg/mL의 올리푸다제 알파 농도를 산출할 수 있다. 재구성된 조성물은 투여될 용량에 기반하여 비체적까지 0.9% 염화나트륨 용액에 추가로 희석될 수 있다.

[0317] 일부 구현예에서, 본 발명은 3 내지 5 mg의 올리푸다제 알파, 15 내지 17 mg의 L-메티오닌, 3 내지 5 mg의 인산나트륨, 및 50 내지 60 mg의 수크로스를 포함하는 동결건조된 약제학적 조성물을 함유하는 바이알을 제공한다. 사용 전에, 조성물은 0.8 내지 1.2 mL의 멸균수에 재구성될 수 있다.

[0318] 특정 구현예에서, 바이알은 4.8 mg의 올리푸다제 알파, 17.9 mg의 L-메티오닌, 2.0 mg의 인산나트륨 이염기성 칠수화물, 2.3 mg의 인산나트륨 일염기성 일수화물, 및 60 mg의 수크로스를 포함하거나 이로 이루어진 동결건조된 약제학적 조성물을 함유한다. 특정 구현예에서, 동결건조된 약제학적 조성물은 케이크 또는 동결건조된 분말의 형태이다. 동결건조된 조성물은 0 내지 0.06 mg의 아연을 선택적으로 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어 제조 프로세스로부터 잔류하거나 외부에서 첨가될 수 있다. 특정 구현예에서, 바이알은 내부적으로 멸균된 질소 충전 분위기를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 동결건조된 조성물은 1.1 mL의 멸균수에 재구성되어, 약 4.0 mg/mL의 올리푸다제 알파 농도를 산출할 수 있다. 재구성된 조성물은 투여될 용량에 기반하여 비체적까지 0.9% 염화나트륨 용액에 추가로 희석될 수 있다.

[0319] *제조 물품*

[0320] 본원에 기술된 방법에 의해 정제된 rASM 및/또는 본원에 기술된 방법에 의해 정제된 rASM을 포함하는 제형은 제조 물품 내에 함유될 수 있다. 제조 물품은 rASM 및/또는 rASM 제형을 함유하는 용기를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 제조 물품은 하기를 포함한다: (a) 용기 내에 본원에 기술된 rASM 및/또는 rASM 제형을 포함하는 조성물을 포함하는 용기; 및 (b) 제형을 대상체에 투여하기 위한 지침이 있는 패키지 삽입물.

[0321] 제조 물품은 용기 및 용기 상의 또는 그와 결부된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 제형을 보유하거나 함유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 주머니 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 폴리펩티드이다. 표지 또는 패키지 삽입물은 제공되는 폴리펩티드 및 임의의 다른 약물의 투약량 및 간격에 관한 구체적인 지침과 함께 대상체에서의 조성물의 용도를 나타낸다. 제조 물품은 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 용기는 시린지이다. 일부 구현예에서, 시린지는 주사 디바이스 내에 추가로 함유된다. 일부 구현예에서, 주사 디바이스는 자동주사기이다.

[0322] "패키지 삽입물"은 치료용 생성물의 상업적인 패키지에 관례상 포함된 지침을 지칭하기 위해 사용되며, 이 지침은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기사항, 패키징된 생성물과 조합될 다른 치료용 생성물 및/또는 이러한 치료용 생성물의 사용에 관련된 경고에 관한 정보를 포함한다.

[0323] 실시예

[0324] 하기 실시예는 본 발명에서 특징으로 하는 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법의 완전한 개시내용 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확도를 보장하기 위해 노력했지만, 일부 실험 오차 및 편차를 고려해야 한다.

[0325] **실시예 1: rhASM 비활성에 대한 정제의 영향**

[0326] 프로세스 특성화 연구 동안, rhASM 비활성에 영향을 미치는 인자를 더 잘 이해하기 위해 노력하였다. 이러한 프로세스 특성화 연구의 목적은 제조 프로세스가 rhASM 생성물 비활성에 어떻게 영향을 미치는지를 이해하고, 생성물의 비활성을 제어하기에 충분한 중요한 단계를 찾는 것이었다.

[0327] rhASM의 몇몇 상이한 아이소폼이, 생물반응기에서 생산된 ASM 집단에 존재한다. rhASM 아이소폼의 세부사항은 표 1에 기술되어 있다. 연구는 이합체화된 형태의 rhASM이 단량체 형태의 rhASM과 비교하여 더 높은 비활성을 보유한다는 것을 식별하였다(도 3). 또한, C-말단 시스테인(C570)에서 화학적으로 변형된 올리푸다제 알파의 아이소폼은 아마도 C570과 활성 부위 사이의 회합으로 인해 비변형된 형태보다 더 높은 비활성을 보유한다. 연구는 C-말단 변형된 형태의 풍부도와 증가된 비활성 사이의 상관관계를 추가로 입증한다(도 4). 본질적으로, 조성물에 더 높은 풍부도의 변형된 rhASM이 있는 경우, 조성물은 더 높은 비활성을 가질 것이다.

[0328] rhASM을 포함하는 샘플을 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피로 처리하였다. 불순물이 통과하여 흐르는 동안 rhASM은 수지에 결합된다. 로딩-후 세척을 이용하여 추가 불순물 감소를 달성한 다음, 세척 완충액과 비교하여 염 농도를 증가시킴으로써 컬럼으로부터 올리푸다제 알파를 용출시켰다.

[0329] 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 용출액을 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의해 추가로 정제하였다. 수지를 금속 이온으로 채웠다. 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 용출액을 표적 pH로 조정하고, 평형화된 IMAC 컬럼 상에 로딩하였다. 그런 다음, rhASM을 고염 용출 완충액으로 용출시켰다.

[0330] 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC) 용출액을 수집하고, 혼합하고, 농축하였다. 이어서, 수득된 벌크 샘플을 실시예 2에 기술된 바와 같이 제형화하였다.

[0331] rhASM 제제의 순도(RP-HPLC에 의해 측정된 바와 같음)가 CEX 크로마토그래피 및/또는 IMAC 단계에서 잘 제어되는 것으로 밝혀졌다. 도 5에 나타낸 바와 같이, CEX 크로마토그래피 단계에서, 더 큰 HCP 제거율은 더 높은 pH, 더 높은 염 농도에서 달성되었지만, 더 큰 HCP 제거율은 더 낮은 회수 수율(recovery yield)을 야기하였다. 유사하게, 도 6에 나타낸 바와 같이, IMAC 단계에서, 더 큰 HCP 제거율을 더 낮은 pH, 더 높은 염 농도에서 달성하였지만, 더 큰 HCP 제거율은 더 낮은 수율도 야기하였다. 회수율을 A280 흡광도 및 활성 수준 둘 모두에 의해 측정하였다. HCP 수준을 Octet® 검정 및 ELISA 둘 모두에 의해 측정하였다.

[0332] 놀랍게도, 우수한 HCP 제거율을 초래하는 조건은 비활성에 유해한 영향을 미쳤다. 도 7에 나타낸 바와 같이, CEX 크로마토그래피 단계에서, 더 큰 HCP 제거율을 더 높은 pH, 더 높은 염 조건에서 달성하였지만, 수득된 rhASM 제제는 더 낮은 비활성을 가졌다. 유사하게, IMAC 단계에서, 도 8에 나타낸 바와 같이, 더 큰 HCP 제거율을 더 낮은 pH, 더 높은 염 조건에서 달성하였지만, 수득된 rhASM 제제는 더 낮은 비활성을 가졌다.

[0333] 본 발명자들은 고도로 활성인 rhASM 아이소폼이 크로마토그래피 컬럼에 약하게 결합되고 크로마토그래피 단계의 세척 단계에서 손실된다는 가설을 세웠다.

[0334] 이 가설을 시험하기 위해, CEX 크로마토그래피 단계에서, 로드 재료(예를 들어, 생성물 풀 - CEX 크로마토그래피 단계 전의 rhASM 샘플), CEX 크로마토그래피 단계에서 수득된 세척 분획, 및 CEX 크로마토그래피 단계에서 수득된 용출액 분획을 분석하여, 실시예 4에 기술된 바와 같이 시험관내에서 이들의 비활성을 결정하였다. 실제로, CEX 동작으로부터 수집된 세척 분획은 초기 로드 재료 및 용출액 분획보다 더 큰 비활성을 나타냈다(명시된 세척 조건에서 도 9). 몇몇 다른 염 농도/pH 세척 조건도 시험하였으며, 이는 유사한 결과를 야기하였다.

[0335] IMAC 단계에서, 로드 재료(예를 들어, 생성물 풀 - IMAC 크로마토그래피 단계 전의 rhASM 샘플), IMAC 단계에서 수득된 세척 분획, 및 IMAC 단계에서 수득된 용출액 분획도 분석하여, 시험관내에서 이들의 비활성을 결정하였다. 유사하게, IMAC 동작으로부터 수집된 세척 분획은 초기 로드 재료 및 용출액 분획보다 더 큰 비활성을 나타냈다(명시된 세척 조건에서 도 10a). 도 10b는 IMAC 동작이 용출액 분획에서 rhASM의 순도를 추가로 개선하였음을 보여준다. 98% 또는 99% 초과의 순도가 달성되었다. 몇몇 다른 염 농도/pH 조건도 시험하였으며, 이는 유사한 결과를 야기하였다.

[0336] 추가로 검증하기 위해, CEX 동작 및 IMAC 동작의 로드 재료, 세척 분획 및 용출액 분획을 질량 분석법 분석을 위해 제출하여 비변형된 아이소폼 및 변형된 아이소폼을 정량화하였다. rhASM의 유리 시스테인 잔기를, ASM 아이소폼 자손을 분석하기 전에 표지하였다. 비변형된 아이소폼 및 변형된 아이소폼의 상대적 풍부도는 도 11(CEX 동작) 및 도 12(IMAC 동작)에 도시되어 있다. 실제로, 두 동작 모두에서, C-말단 변형을 갖는 rhASM 아이소폼이 세척 분획에서 풍부하였다.

[0337] CEX 동작을 통해, 비변형된 rhASM 아이소폼 및 변형된 rhASM 아이소폼의 상대적 풍부도가 세척 분획 및 용출액 분획 둘 모두에서 변화된다는 것도 관찰하였다. LC-MS 분석에서는 용출액 분획에서 비변형된 rhASM 아이소폼의 상대적 풍부도가 로드 재료와 비교하여 풍부함을 보여주었다. 용출액 집단에서 모든 변형된 rhASM 아이소폼은 로드 재료와 비교하여 더 낮았다. 따라서, CEX 동작은 rhASM 생성물에서 비변형된 rhASM 아이소폼 및 변형된 rhASM 아이소폼 간의 비를 조절할 수 있다.

[0338] 요약하면, 올리푸다제 알파의 제조 프로세스에서 2 개의 결합-및-용출 크로마토그래피 단계의 최적화는 비활성 및 rhASM 아이소폼 집단에 대한 예상치 못한 영향을 초래했다. 비활성은 두 동작 모두에 걸쳐 감소하는 것으로 관찰되었으며, 두 동작 모두에 대한 세척 분획에서 높은 비활성이 관찰되었다. 질량 분석법에 의해 세척 분획에서 풍부하고 용출액 분획에서 감소된 약하게 결합된 "활성화된" rhASM 아이소폼을 식별하였다. 두 연구 모두에 대한 분석 결과는 CEX 또는 IMAC 동작의 용출액에서의 비활성이 세척 단계 동안 고도로 활성인 C-말단 변형된 종의 선택적 제거에 의해 저하될 수 있음을 시사한다. 또한, 동작은 rhASM 제제에서 비변형된 rhASM 아이소폼과 변형된 rhASM 아이소폼 사이의 비를 조절하여, 최종 생성물에서 rhASM 집단의 균일성을 개선할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 프로세스는 제조 프로세스 동안 비변형된 rhASM 아이소폼 및 변형된 rhASM 아이소폼의 비활성 및 비의 조절을 가능하게 하여, 원하는 비활성을 갖는 rhASM 제제를 수득할 수 있다.

[0339] **실시예 2: 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제 제형**

[0340] 제형 단계는 약물 물질에서 최종 올리푸다제 알파 및 부형제 농도를 달성하기 위해 수행된다.

[0341] 제형은 WO 2019/227029 A1호에 기술된 방법에 따라 수행되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 실시예 1의 정제 프로세스로부터 수득된 rhASM 제제를 여과하여, 바이러스 오염을 제거하고, 농축하여, 제형화 전에 단백질 농도를 증가시켰다. 제형화된 벌크를 혼합하고, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 rhASM 농도를 결정하였다. 그런 다음, 생성물 풀을 표적 체적으로 추가로 희석하여, 최종 약물 물질인 올리푸다제 알파 농도를 수득하였다.

[0342] 선택적으로, 본원에서 수득된 액체 조성물은 분무-건조될 수 있다. 분무-건조된 조성물은 장기간의 저장에 적합하다. 분무-건조는 당업계에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 액체 조성물을 아토마이저 또는 분무 노즐을 통해 강제로 주입하여, 이를 제어된 크기의 작은 액적으로서 챔버 내의 고온 가스 스트림 내로 분산시킴으로써, 액체 조성물을 분말로 신속하게 건조시킬 수 있다. 그런 다음, 건조된 분말을 건조 챔버의 바닥에서 수집할 수 있다. 분말화된 조성물을 제조하기 위한 다른 건조 방법도 고려된다.

[0343] **실시예 3: 산성 스핑고미엘리나제 결핍증을 갖는 환자에서 올리푸다제 알파의 효능, 안전성, 약력학 및 약동학 연구**

[0344] 실시예 2에서 제조된 재조합 인간 올리푸다제 알파 제형을 임상 연구에 사용하여 이의 효능을 평가하였다. 연구 설계는 도 13에 나타나 있다. 기준선 환자 및 질환 특성은 표 6에 제공되어 있다.

[0345] [표 6]

[0346] **기준선 환자 및 질환 특성**

[0347]

파라미터	위약 (N=18)	올리푸다제 알파 (N=18)
기준선에서의 평균 연령(단위: 세)(범위)	33.5 (18.6-65.9)	36.2 (18.8-59.9)
진단 시 평균 연령(단위: 세) ± SD	14.6 ± 16.1	21.4 ± 20.3
성별, 남성/여성, n(%)	5 (28%) / 13 (72%)	9 (50%) / 9 (50%)
헤모글로빈에 대해 조정된 평균 예측된 DL_{CO}% ± SD	48.5 ± 10.8	49.4 ± 11.0
평균 비장 체적(단위: MN) ± SD	11.21 ± 3.84	11.70 ± 4.92
평균 비장비대-관련 점수(SRS) ± SD	28.05 ± 10.6	24.55 ± 11.1
평균 간 체적(단위: MN) ± SD	1.62 ± 0.50	1.44 ± 0.32
평균 혈소판 수 x 10^9/L ± SD	115.6 ± 36.3	107.2 ± 26.9

[0348] DL_{CO} = 일산화탄소에 대한 확산 능력; MN = 정상의 배수; SD = 표준 편차; SRS = 비장비대-관련 점수

[0349] 본 연구의 일차 목적은 하기의 변화를 평가함으로써 산성 스핑고미엘리나제 결핍증(ASMD)을 갖는 성인 환자에서 52 주 동안 2 주마다 1 회 정맥내로 투여된 제형의 효능을 평가하는 것이었다: 1) 복부 자기 공명 영상(MRI)에 의해 측정된 바와 같은 비장 체적(및, 비장비대 관련 점수[SRS]에 의해 측정된 바와 같은 비장 체적과 관련된 환자 인식과 관련하여 미국[US]의 경우에만); 및 2) 폐 기능 시험인 일산화탄소에 대한 폐의 확산 능력(DLCO)에 의해 측정된 바와 같은 침윤성 폐 질환.

[0350] *일차 평가변수 - 예측된 DL_{CO}의 변화 퍼센트(단위: %)*

[0351] 도 14에 나타낸 바와 같은 결과는 기준선에서, 두 그룹 모두에서 평균 예측된 DL_{CO}%가 유사하고 중등도 질환을 반영하였고; 기준선으로부터 52 주차까지의 평균 개선이 위약 그룹의 경우에는 3%였던 것과 대조적으로 올리푸다제 알파 그룹의 경우에는 22%였고; 그룹 간 차이가 52 주차에 19%였고($p<0.0004$), 이르면 26 주차에 개선이 보였으며; 연구가 긍정적인 것으로 선언되었고; 평균 예측된 FVC%가 또한 52 주차에 올리푸다제 알파 그룹에서 개선되었지만 위약 그룹에서는 개선되지 않았음을 나타낸다.

[0352] 폐 영상 연구는 또한 ASMD-매개 간질성 폐 질환의 개선을 보여주었다. 올리푸다제 알파-치료된 환자로부터의 예시적인 고해상도 컴퓨터 단층촬영 영상(도 15)은 스핑고미엘린으로 충전된 대식세포에 의해 야기되는 "간유리" 음영의 제거율을 보여준다. 양쪽 폐에서 HRCT 간유리 모양 점수 및 간질성 폐 질환 점수는 올리푸다제 알파 치료된 환자에서 평균 개선을 나타냈지만 위약 치료된 환자에서는 그렇지 않았다(도 16).

[0353] *일차 평가변수 - 비장 반응*

[0354] 비장 체적은 모든 올리푸다제 알파 치료된 환자에서 감소되었지만, 위약 치료된 환자에서는 그렇지 않았다(도 17, 좌측 패널). 평균 기준선 비장 체적은 위약 그룹에서 11.2 MN(정상의 배수)이었고, 올리푸다제 그룹에서 11.7 MN이었으며, 이는 중등도 비장비대를 나타낸다. 올리푸다제 알파 치료된 환자에서, 6 개월의 치료에 의해 비장 체적의 상당한 감소가 나타났고, 가장 나쁜 기준선 비장비대를 가졌던 환자에서 가장 큰 감소가 나타났다. 52 주차에 올리푸다제 알파 치료된 환자에서 비장 크기가 통계적으로 유의하게 39% 감소한 반면, 위약 환자에서는 0.5% 증가한 것으로 나타났다($p<0.0001$). 추가로, 올리푸다제-알파-치료된 환자 18 명 중 17 명(94%)에서 비장 체적이 30% 이상 감소한 반면, 위약 환자 18 명 중에서는 아무도 이러한 감소를 보이지 않았다. 기준선에서 가장 큰 비장을 갖는 올리푸다제 알파 치료된 환자에서 가장 큰 감소가 관찰되었다.

[0355] 비장비대-관련 점수를 또한 올리푸다제 알파 치료된 환자 및 위약 치료된 환자에서 계산하였으며, 이는 두 그룹 모두에서 동시에 감소하였다(도 17, 우측 패널). SRS와 기준선 또는 최종 비장 체적 간에는 상관관계가 없었으며; 따라서, SRS에 의해 측정된 증상은 생리학적 질환 부담을 반영하지 않았다. 평균 기준선 SRS 점수는 위약의 경우 28.1, 올리푸다제 알파의 경우 24.6이었다. 두 아암 모두는 SRS 점수의 감소를 나타냈지만; 기준선으로부터 52 주차까지의 SRS 점수의 LS 평균 변화는 다중도 조정 후 위약 그룹(-9.28)과 비교하여 올리푸다제 알파 그룹(-7.66)에서 통계적으로 상이하지 않았다; $p = 0.6364$. 주목할 점은, SRS는 골수섬유증 시험으로부터 조정(adapt)되었으며, ASMD 환자에서 이전에 검증되지 않았다.

[0356] *이차 평가변수 - 간 반응*

[0357] 환자는 죽종형성 지질 프로파일 및 비정상적인 간 기능 시험 외에도, 위약 그룹에서 1.6 MN, 올리푸다제 알파 그룹에서 1.4 MN의 평균 간 체적을 갖는 중등도 기준선 간비대를 가졌다.

[0358] 기준선으로부터 52 주차까지의 간 체적의 LS 평균 백분율 변화는 위약 그룹(1.42%, 공칭 $p <0.0001$)과 비교하여 올리푸다제 알파 그룹(31.67%)에서 더 큰 감소를 나타냈다. (도 18). 유사하게, LDL 콜레스테롤 및 트리글리세라이드의 평균 감소 및 HDL 콜레스테롤의 증가와 함께 기준선 죽종형성 지질 프로파일은 올리푸다제-알파-치료된 환자에서 개선되었지만 위약 환자에서는 그렇지 않았다. 평균 ALT 및 AST 및 다른 간 기능 시험은 또한 올리푸다제-알파 치료된 환자에서 개선되었지만 위약-치료된 환자에서는 그렇지 않았다.

[0359] *이차 평가변수 - 혈소판 수*

[0360] 평균 혈소판 수는 올리푸다제 알파-치료된 환자에서 개선되었지만 위약-치료된 환자에서는 그렇지 않았으며(각각 +16.8% 대 +2.5%, $p=0.019$), 26 주차 이내에 임상적 차이를 보였다.

[0361] *탐색적 평가변수 - 간 스핑고미엘린*

[0362] 간 스핑고미엘린 수준을 올리푸다제 알파 치료된 환자 및 위약 치료된 환자에서 모니터링하였다. 올리푸다제 알파 치료된 환자에서, 스핑고미엘린이 차지하는 평균 조직 면적 퍼센트는 52 주 후에 29%로부터 2%까지 감소하였지만, 위약 환자에서는 변화하지 않았다(도 19). 대표적인 간 생검 영상에 의해 입증된 바와 같이, 간 생검 데이터의 조직학적 분석은 올리푸다제 알파 치료된 환자에서 쿠퍼 세포 및 간세포 내의 스핑고미엘린의 상당한 제거율을 나타냈지만, 위약 치료된 환자에서는 그렇지 않았다(도 20).

[0363] *탐색적 평가변수 - 바이오마커 반응*

[0364] 혈장 바이오마커인 키토트리오시다제 및 리소-스핑고미엘린의 평균 수준은 둘 모두 기준선에서 현저하게 상승되었다. 두 그룹 모두에서 기준선 값은 하기와 같았다: 키토트리오시다제의 경우 ULN의 14x 초과 및 리소-스핑고미엘린의 경우 ULN의 38x 초과. 평균 키토트리오시다제 수준은 52 주차에 올리푸다제 알파 그룹에서 54% 감소한 반면, 위약의 경우에는 12% 감소하였다. 평균 리소-스핑고미엘린은 52 주차에 위약의 경우 6% 감소한 것과는 대조적으로 올리푸다제 알파 그룹에서는 78% 감소하였다. 둘 모두는 올리푸다제-알파-치료된 환자에서 치료의 첫 주부터 시작하여 상당한 감소를 나타냈지만, 위약-치료된 환자에서는 그렇지 않았다(도 21).

[0365] *요약*

[0366] 전반적인 안전성 및 내약성 프로파일은 이 시험에서 식별된 새로운 안전성 위험 없이 유리하였다. 사망한 환자는 없었으며, 이상 사례로 인한 올리푸다제 알파의 영구적인 중단은 없었다. 불량한 순응으로 인해 일차 분석 기간 동안 중단한 1 명의 환자를 제외하고 모든 환자가 시험 연장을 계속하였다. 3 명의 올리푸다제 알파 치료된 환자는 5 건의 심각한 이상 사례를 가졌고, 4 명의 위약 환자는 11 건의 심각한 이상 사례를 가졌지만, 어떠한 심각한 이상 사례도 치료와 관련된 것으로 간주하지 않았다. 효소 대체 요법을 시작하는 환자에서 예상되는 주입-연관 반응은 경미하거나 중등도였으며, 쉽게 관리되었다. 올리푸다제 알파 치료된 환자 18 명 중 4 명에서

치료-유도된 항-약물 항체가 발달하였으며; 이들 환자 중 2 명은 일시적 항체를 가졌고, 나머지 2 명의 환자는 지속적이지만 낮은 항체 역가를 가졌다. 어떠한 환자에서도 효소의 세포 흡수를 방해하는 중화 항체가 발달되지 않았다.

[0367] 연구는 DL_{CO} 평가변수를 충족하고, 총체적인 데이터가 임상적 이익을 입증하기 때문에 긍정적인 것으로 선언된다. ASMD-연관 간질성 폐 질환은 본원에 기술된 바와 같은 방법에 의해 생산된 rhASM을 이용하여 치료된 환자에서 개선되었다. 혈소판 수의 증가와 함께 비장 체적은 감소되었으며, 이는 비기능항진증의 교정을 반영하였다. 간 체적은 연속 간 생검으로부터의 조직학적 증거에 의해 뒷받침되는 스핑고미엘린의 제거율로 인해 감소되었다. 간 기능 시험 및 지질 프로파일의 개선에 의해 입증된 바와 같이, 대사 기능이 개선되었다. SRS에 의해 측정된 증상은 생리학적 척도(비장 체적)에 의해 측정된 바와 같이 질환 부담을 반영하지 않았다. 이 연구에 기반하여 ASMD를 갖는 성인에서 올리푸다제 알파에 대한 이익-위험 프로파일은 유리하다.

[0368] 임상 연구는 본 개시내용에 기술된 바와 같은 방법에 의해 제조된 rhASM 조성물이 ASMD 환자를 치료하는 데 있어서 탁월한 안전성 및 효능을 나타냈음을 시사한다.

[0369] **실시예 4: rhASM 비활성의 시험관내 활성 검정**

[0370] 이 실시예는 합성 기질인 2-(N-헤즉사데카노일아미노)-4-니트로페닐포스포릴콜린(HDA-PC)의 가수분해에 기반하여 샘플 내의 재조합 인간 산성 스핑고미엘리나제(rhASM)의 활성(단위: U/mL) 및 비활성(단위: U/mg)을 결정하는 방법을 기술한다. rhASM에 의해 촉매된 합성 기질의 가수분해 속도를 다음과 같이 측정하였다.

[0371] 대략 1 μg/mL의 rhASM을 37.0℃ 순환 수조에서 pH 5.3에서 50 mM 아세트산나트륨, 0.1 mM 아세트산아연 및 0.25 mg/mL 소 혈청 알부민(BSA) 내의 1 mM 2-(N-헥사데카노일아미노)-4-니트로페닐포스포릴콜린과 함께 15 분 동안 인큐베이션시켰다. 본질적으로, 80 μL의 기질을 20 μL의 효소에 첨가하여, 반응을 시작하였다. 300 μL의 0.1 M 글리신, 0.1 M NaOH, 50% 에탄올 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고, 방출된 2-(N-헥사데카노일아미노)-4-니트로페놀(HDA-NP) 생성물의 흡광도를 415 nm에서 측정하였다. 활성의 1 단위는 정의된 검정 조건 하에서 분당 1 μmol의 2-(N-헥사데카노일아미노-4-니트로페닐) 포스포릴콜린(HDA-PC)을 2-(N-헥사데카노일아미노-4-니트로페놀(HDA-NP)로 가수분해하는 데 필요한 효소의 양으로서 정의되었다. 효소 활성 결과(단위: U/mL)를 상응하는 rhASM 단백질 농도(단위: mg/mL)로 나누어 비활성(단위: U/mg)을 계산하였다.

[0372] 등가물 및 범주

[0373] 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기술된 구현예의 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범주는 위의 설명으로 제한하고자 하는 것이 아니며, 오히려 첨부된 청구범위에 기술된 바와 같다.

[0374] 단수형("a", "an" 및 "the"과 같은 관사)은 반대로 지시되거나 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한 적어도 하나를 의미할 수 있다. 그룹의 2 개 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은, 반대로 표시되거나 문맥상 달리 명백하지 않은 한, 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 존재하는 경우, 충족되는 것으로 간주된다. 2 개 이상의 그룹의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 그룹의 개시내용은 정확하게 그룹의 하나의 구성원이 존재하는 구현예, 그룹의 하나 초과의 구성원이 존재하는 구현예, 및 모든 그룹 구성원이 존재하는 구현예를 제공한다. 간결성을 위해, 그러한 구현예가 본원에 개별적으로 기재되지는 않았으나, 이들 구현예 각각이 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 포기(disclaim)될 수 있음이 이해될 것이다.

[0375] 본 개시내용은 청구범위 중 적어도 하나 또는 본 설명의 적어도 하나의 관련 부분으로부터의 적어도 하나의 제한, 요소, 조항 또는 기술 용어가 다른 청구범위 내로 도입되는 모든 변동, 조합 및 순열을 포괄함을 이해해야 한다. 예를 들어, 다른 청구범위에 종속된 청구범위는 동일한 기본 청구범위에 종속된 임의의 다른 청구범위에서 발견되는 제한 중 적어도 하나를 포함하도록 변형될 수 있다. 추가로, 청구범위가 조성물을 인용하는 경우, 달리 나타내지 않거나 모순 또는 불일치가 발생할 것이라는 점이 당업자에게 명백하지 않는 한, 존재하는 경우, 본원에 개시된 제조 방법 또는 사용 방법 중 임의의 것에 따라 또는 당업계에 알려진 방법에 따라 조성물을 제조하는 방법 또는 사용하는 방법이 포함됨을 이해해야 한다.

[0376] 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 그룹 형식으로 제시되는 경우, 요소의 가능한 모든 하위그룹도 개시되며, 임의의 요소 또는 요소의 하위그룹이 그룹으로부터 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 용어 "포함하는(comprising)"은 개방적인 것으로 하고자 하며, 추가 요소 또는 단계의 포함을 허용한다는 점에 주목한다. 일반적으로, 구현예, 생성물 또는 방법이 특정 요소, 특징 또는 단계를 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 이러한 요

소, 특징 또는 단계로 이루어지거나, 본질적으로 이로 이루어지는 구현예, 생성물 또는 방법도 제공된다는 것을 이해해야 한다. 간결성을 위해, 그러한 구현예가 본원에 개별적으로 기재되지는 않았으나, 이들 구현예 각각이 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 포기될 수 있음이 이해될 것이다.

[0377] 청구범위뿐만 아니라 위의 명세서에서, "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "운반하는(carrying)", "갖는(having)", "함유하는(containing)", "수반하는(involving)", "보유하는(holding)", 및 "~로 구성된(composed of)"과 같은 모든 전환 어구는 개방형, 즉, 포함하나 이에 제한되지 않는 것(including but not limited to)을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 전환 어구인 "~로 이루어진(consisting of)" 및 "본질적으로 ~로 이루어진(consisting essentially of)"만이 미국 특허청의 특허 심사 절차의 매뉴얼(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures), 섹션(Section) 2111. 03에 기재된 바와 같이 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 전환 어구일 것이다.

[0378] 범위가 주어진 경우, 종점이 포함된다. 추가로, 달리 나타내지 않거나 문맥 및/또는 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않은 한, 범위로서 표현된 값은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 일부 구현예에서 언급된 범위 내에서, 범위의 하한 단위의 1/10까지 임의의 구체적인 값을 가정할 수 있음을 이해해야 한다. 간결성을 위해, 각각의 범위 내의 값이 본원에 개별적으로 기재되지는 않았으나, 이들 값 각각이 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 포기될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 달리 나타내지 않거나 문맥 및/또는 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않은 한, 범위로서 표현된 값은 주어진 범위 내의 임의의 하위범위를 가정할 수 있으며, 여기서 하위범위의 종점은 범위의 하한 단위의 1/10과 동일한 정도의 정확도로 표현됨을 이해해야 한다.

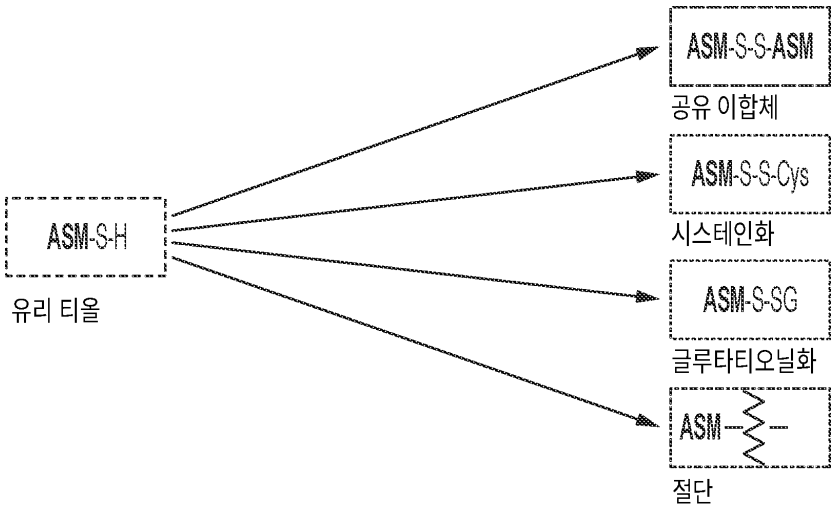
[0379] 웹사이트가 제공되는 경우, URL 주소는 괄호 내에 각각의 웹 주소의 점을 포함하는, 브라우저에서 실행 불가능한 코드로서 제공된다. 실제 웹 주소는 괄호를 포함하지 않는다.

[0380] 또한, 본 개시내용의 임의의 특정 구현예는 청구범위 중 임의의 적어도 하나로부터 명시적으로 배제될 수 있음이 이해되어야 한다. 범위가 주어진 경우, 범위 내의 임의의 값은 청구범위 중 임의의 적어도 하나로부터 명시적으로 배제될 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및/또는 방법의 임의의 구현예, 요소, 특징, 적용, 또는 양태는 임의의 적어도 하나의 청구범위로부터 배제될 수 있다. 간결성을 위해, 적어도 하나의 요소, 특징, 목적 또는 양태가 배제되는 모든 구현예가 본원에 명시적으로 기재되는 것은 아니다.

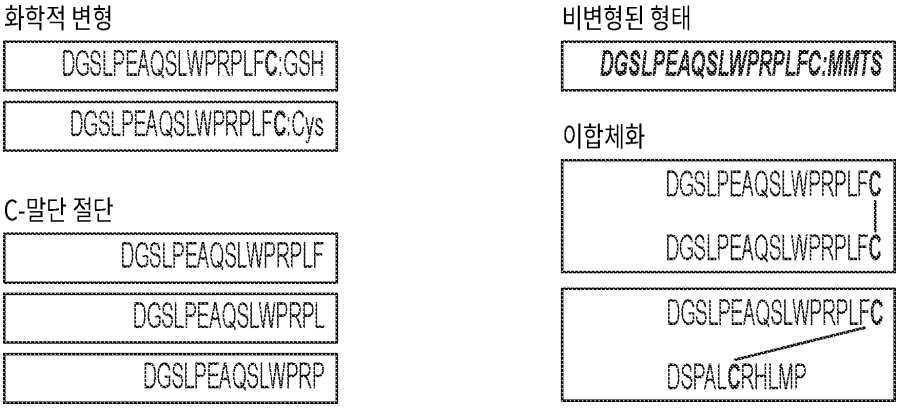
[0381] 본원에서, 예를 들어, 배경, 요약, 상세한 설명, 실시예, 및/또는 참고문헌 섹션에서 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 출원, 공보, 및 데이터베이스 항목(예를 들어, 서열 데이터베이스 항목)은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원, 공보, 및 데이터베이스 항목이 본원에 참조로 구체적이고 개별적으로 포함되는 것처럼 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 상충되는 경우에는, 본원의 임의의 정의를 포함하여 본 출원이 우선할 것이다.

도면

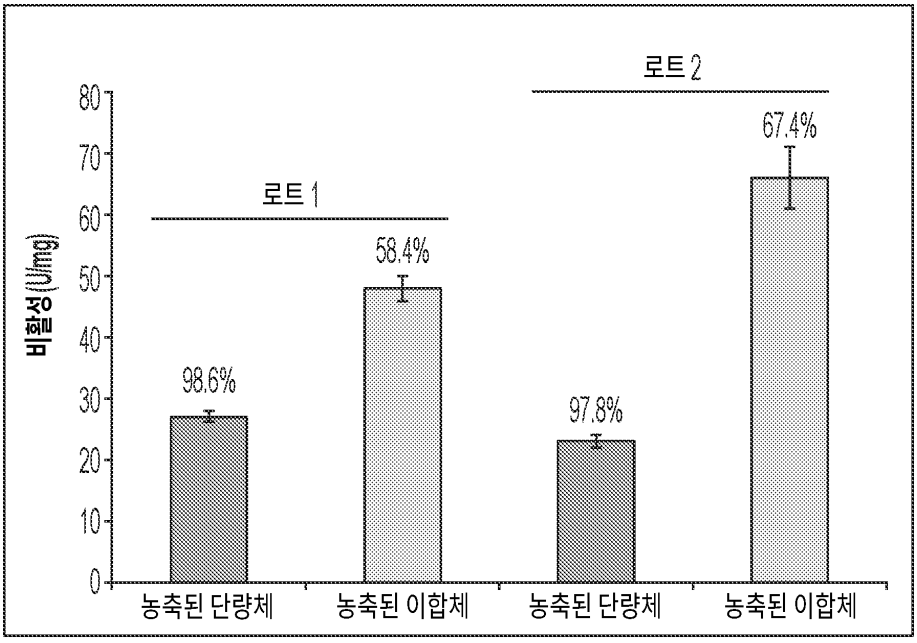
도면1



도면2

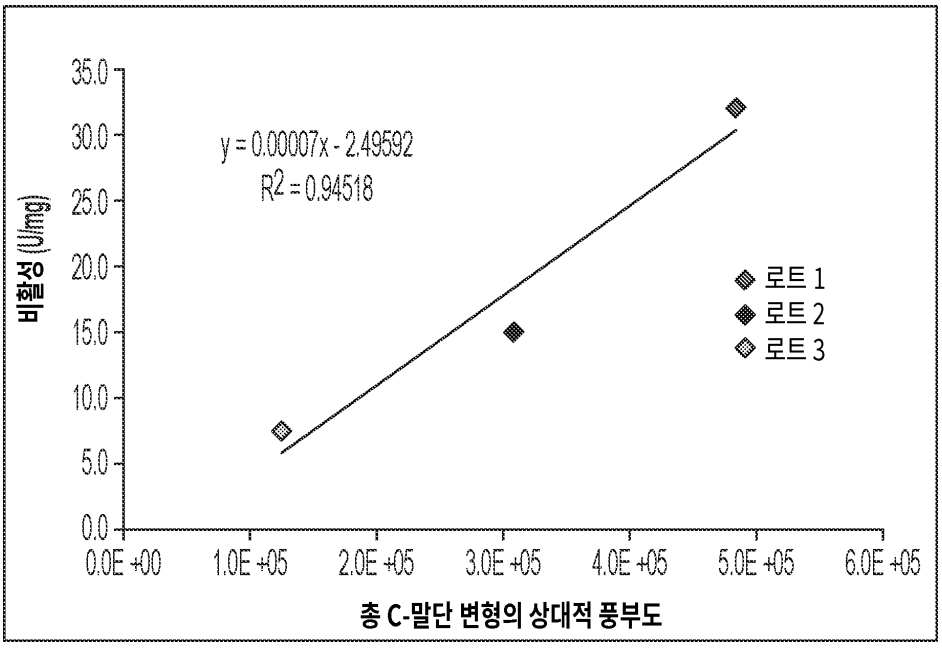


도면3

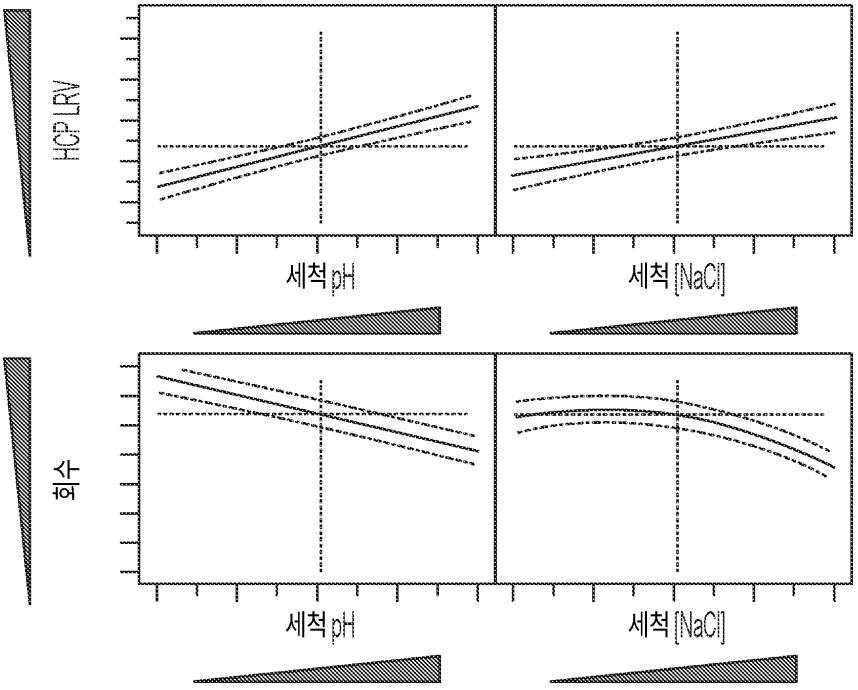


각각의 농축된 집단에 대한 순도 퍼센트는 각각의 막대 위에 표시되어 있음

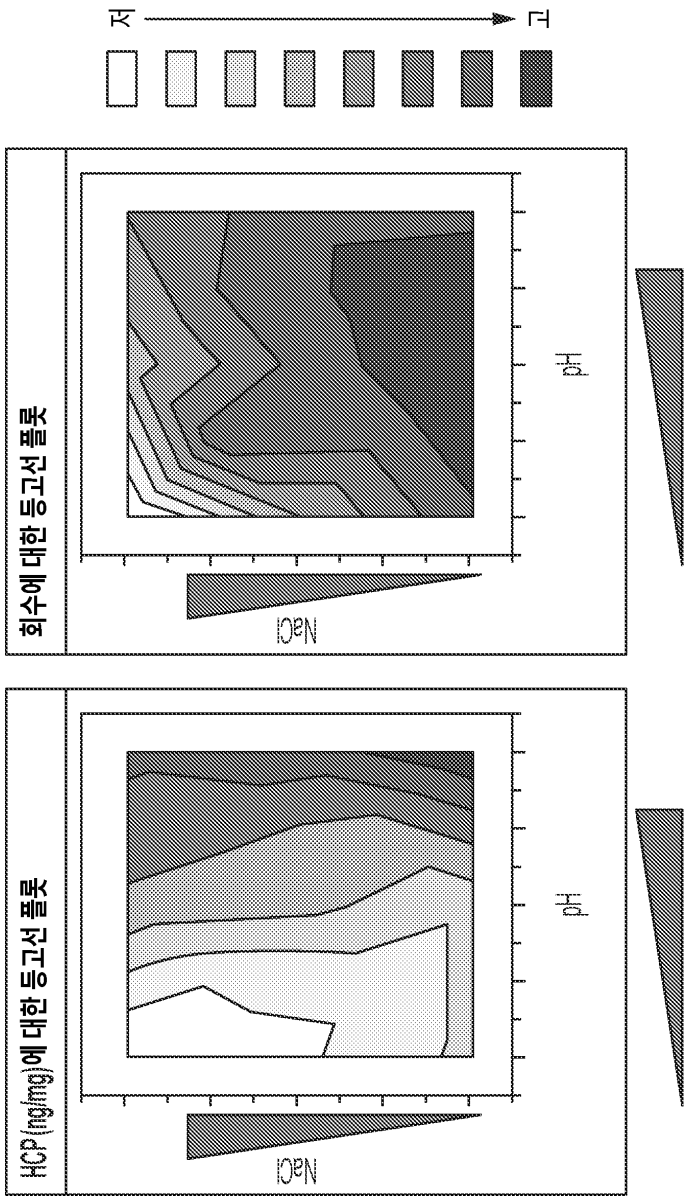
도면4


35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
y = 0.00007x - 2.49592
R2 = 0.94518
비활성 (U/mg)
로트 1
로트 2
로트 3
0.0E +00
1.0E +05
2.0E +05
3.0E +05
4.0E +05
5.0E +05
6.0E +05
총 C-말단 변형의 상대적 풍부도

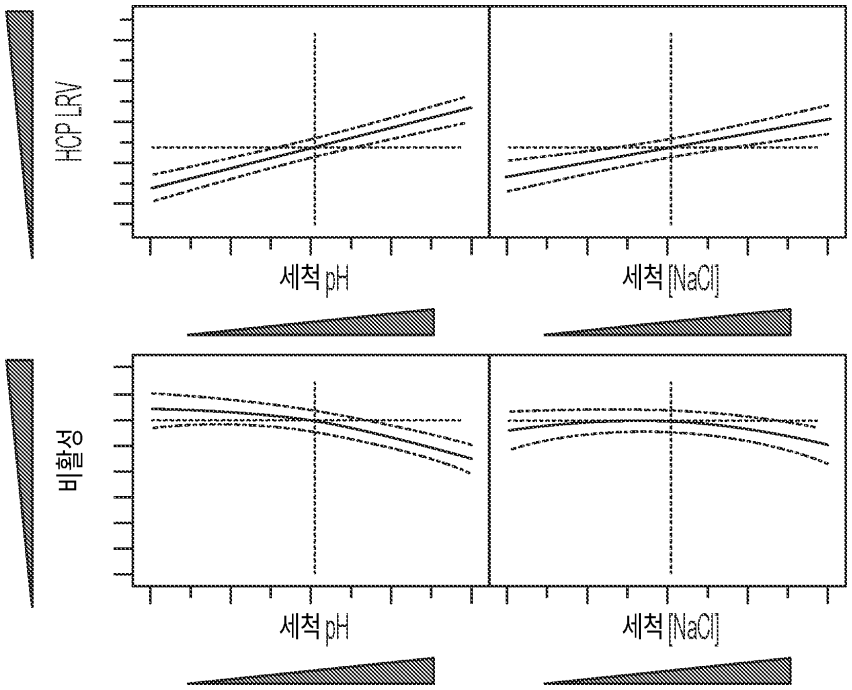
도면5


HCP LRV
세척 pH
세척 [NaCl]
회수
세척 pH
세척 [NaCl]

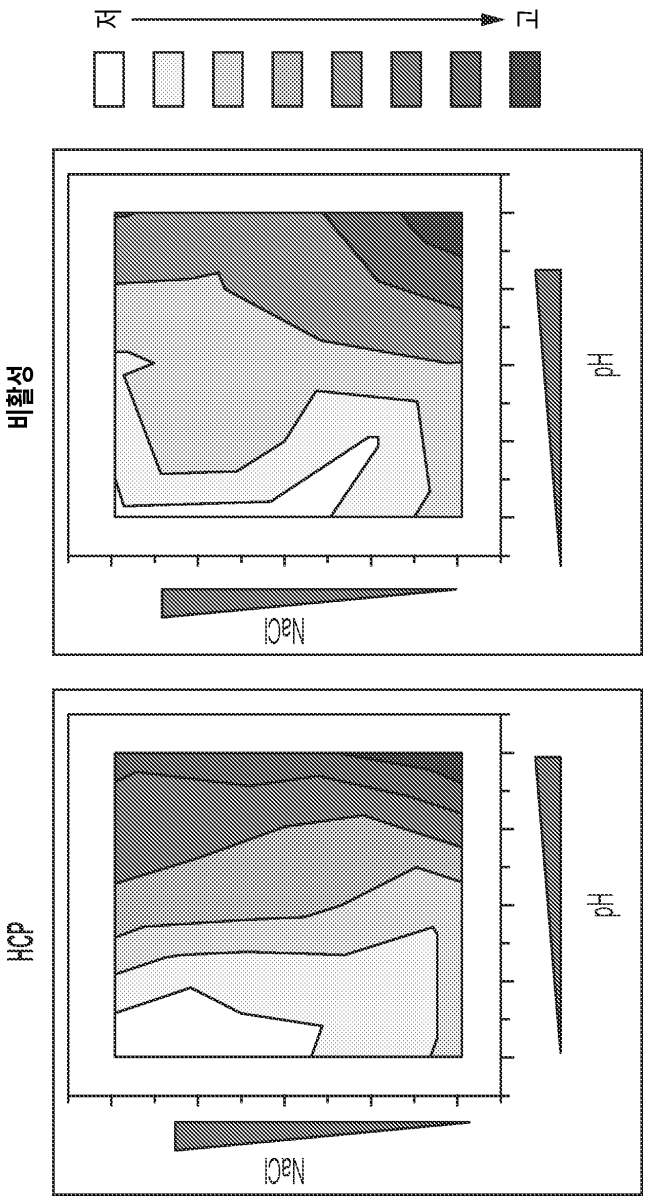
도면6



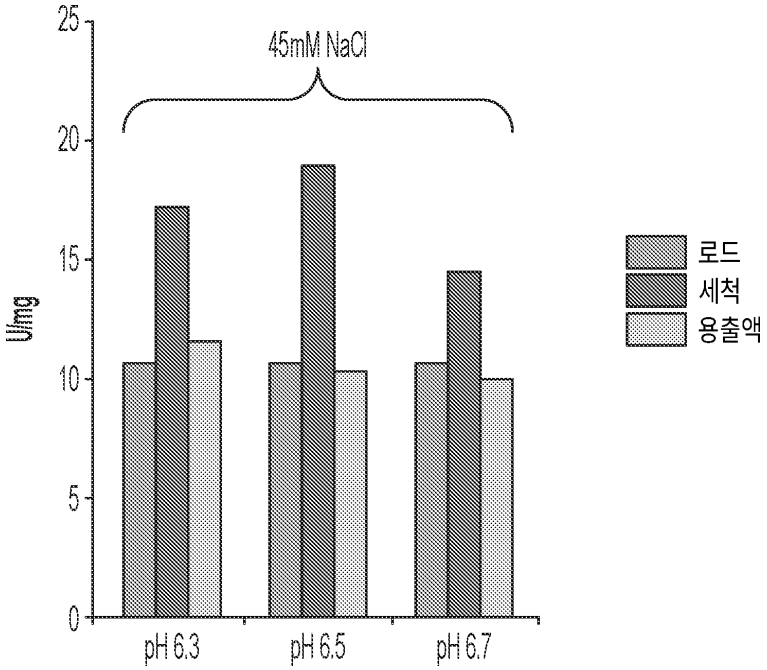
도면7



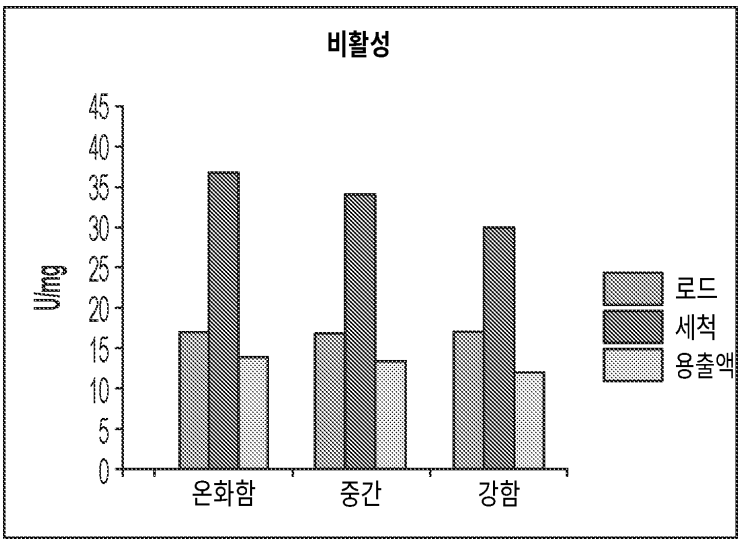
도면8



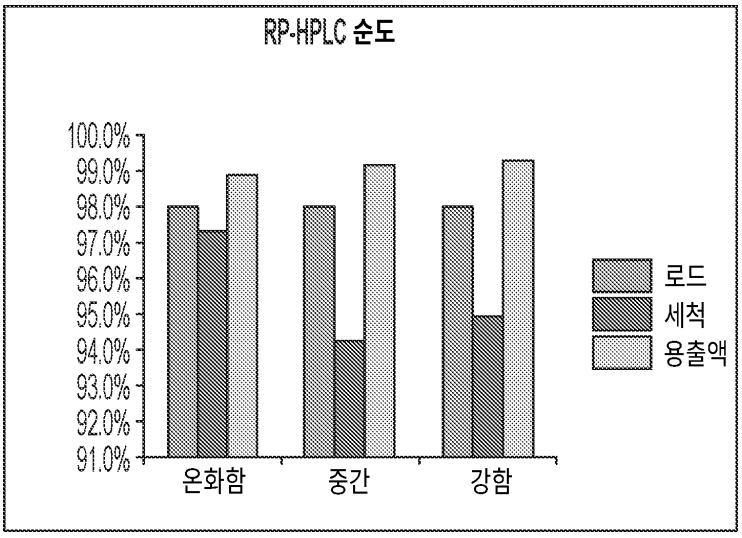
도면9


45mM NaCl
25
20
15
10
5
0
U/mg
pH 6.3
pH 6.5
pH 6.7
로드
세척
용출액

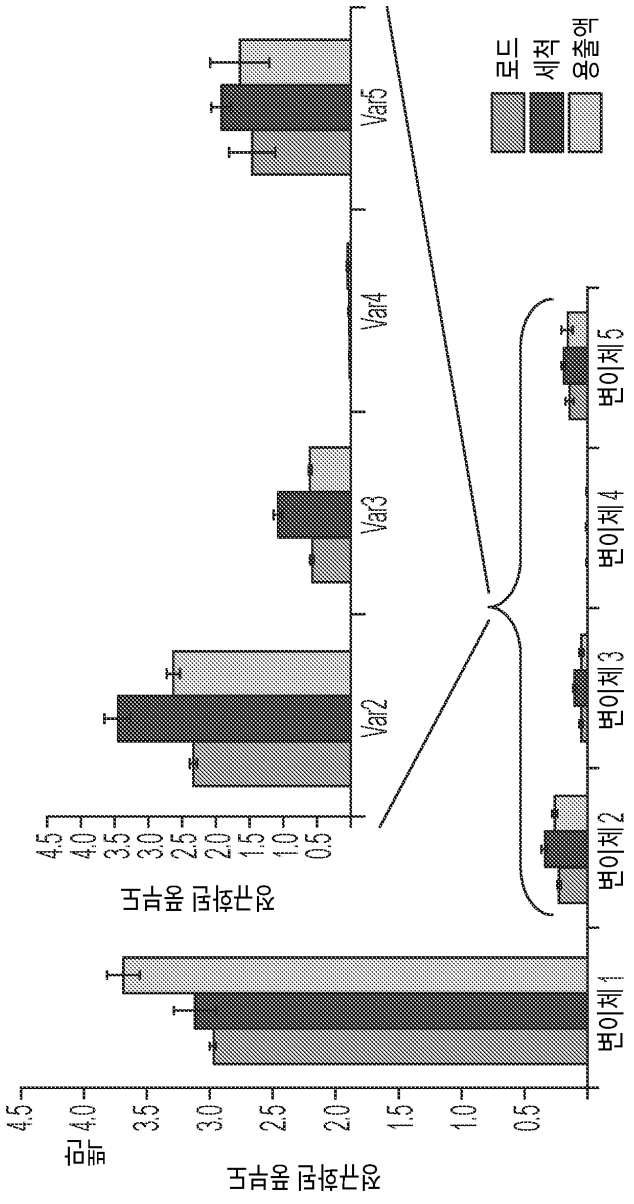
도면10a


비활성
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
U/mg
온화함
중간
강함
로드
세척
용출액

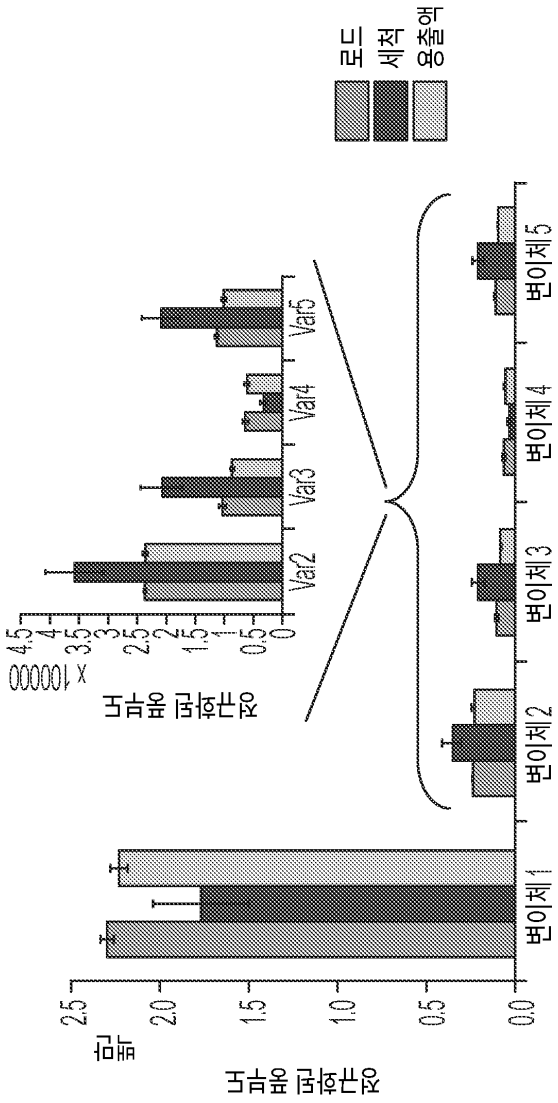
도면10b


RP-HPLC 순도
100.0%
99.0%
98.0%
97.0%
96.0%
95.0%
94.0%
93.0%
92.0%
91.0%
온화함
중간
강함
로드
세척
용출액

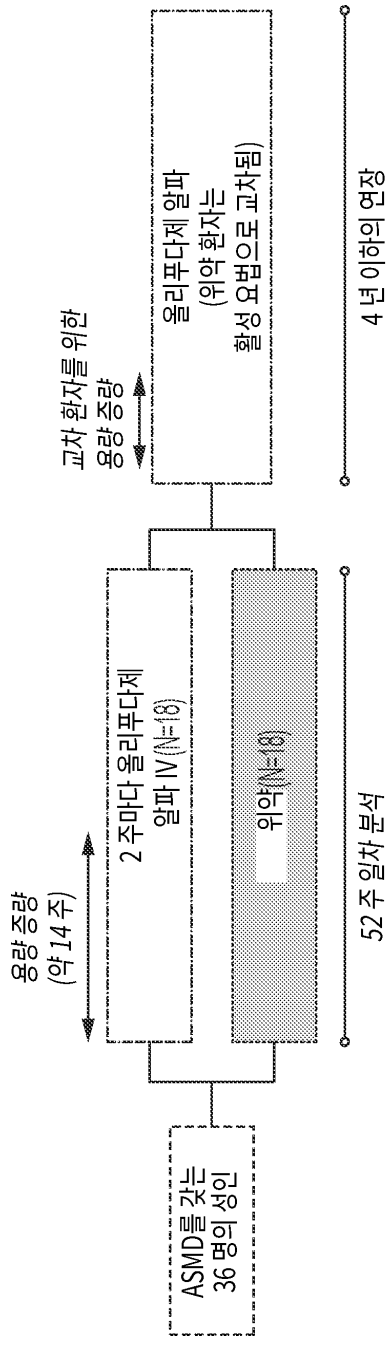
도면11


로드
세척
용출액
Var5
Var4
Var3
Var2
변이체 5
변이체 4
변이체 3
변이체 2
변이체 1
정규화된 풍부도
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5

도면12


모든 세포 종류
정규화된 풍부도
변이체1
변이체2
변이체3
변이체4
변이체5
Var2
Var3
Var4
Var5
x 100000

도면13



주요 포함 기준

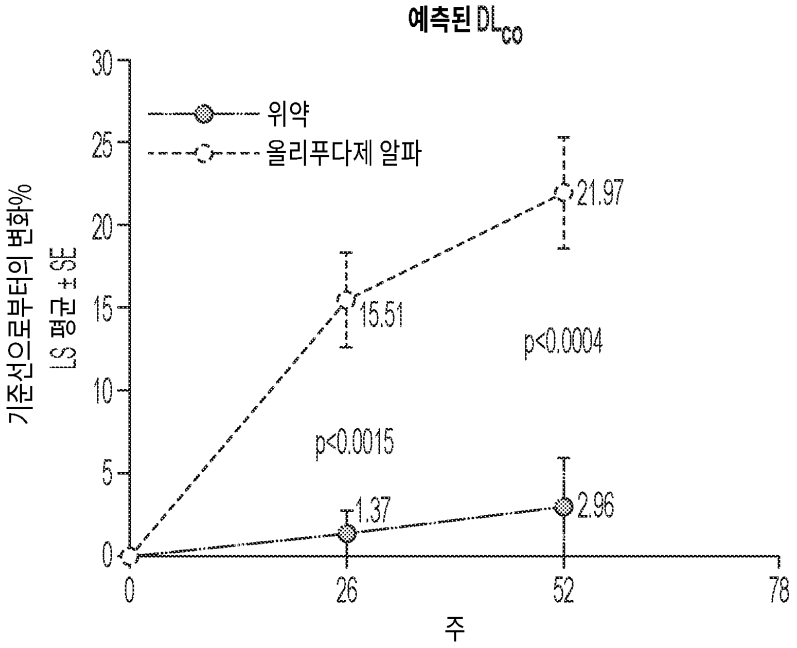
- ASMD 유형 B 진단
- 18 세 이상의 연령
- 일산화탄소에 대한 폐 확산 능력(DL_{co})이 예측된 정상 값의 70% 이하
- 비장 체적이 정상의 6 배수(MN) 이상
- 비장비대-관련 점수(SRS)가 5 이상

기준선으로부터 52 주차까지의 독립적인 평가변수

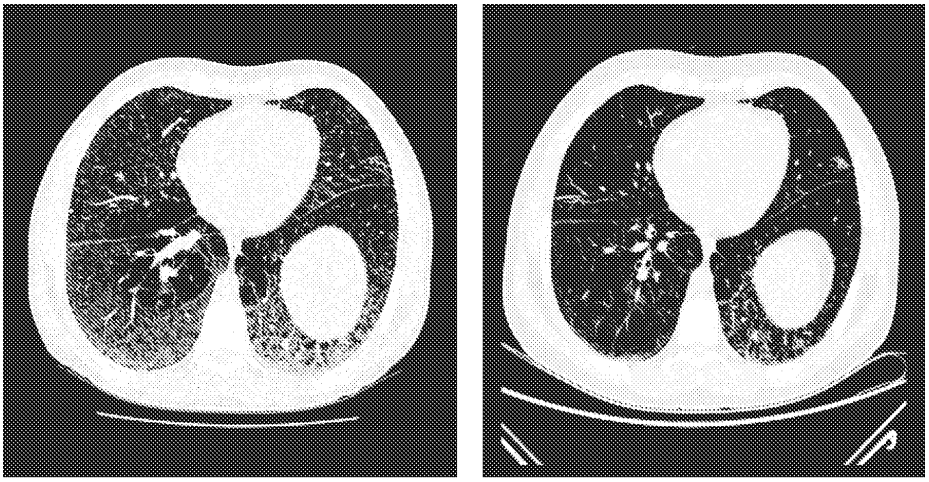
- 예측된 DL_{co}의 변화 퍼센트(단위: 퍼센트)
- MN 단위의 비장 체적의 변화 퍼센트
- SRS의 변화(미국만)

- **일차 평가변수 중 적어도 하나가 통계적으로 유의한 경우, 연구는 긍정적인 것으로 선언됨**

도면14

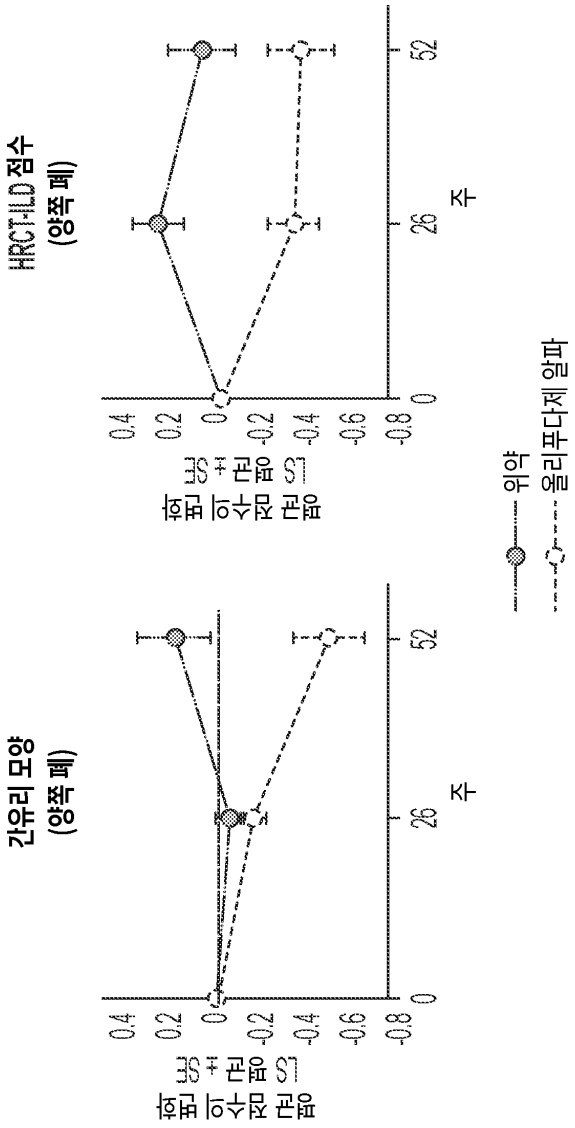


도면15

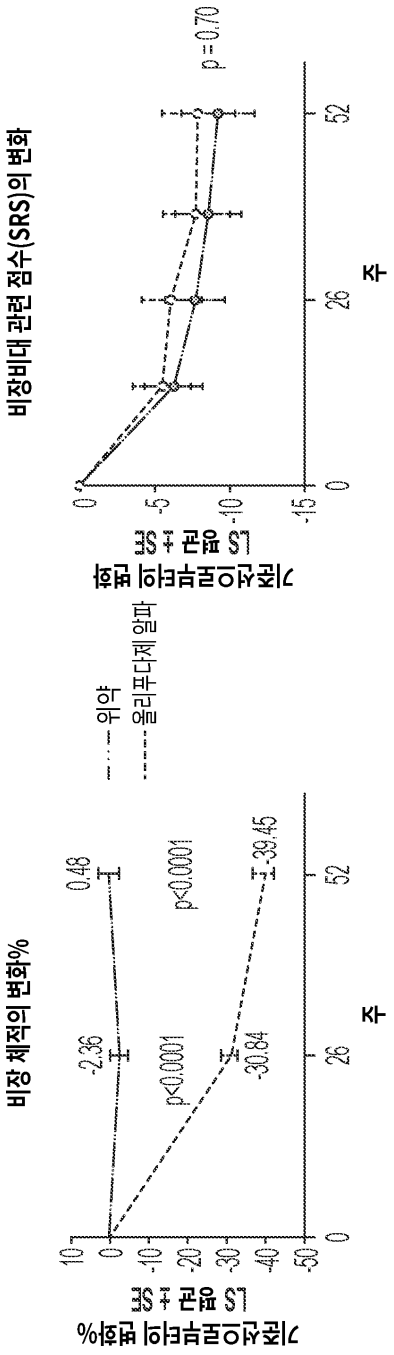


기준선 52주

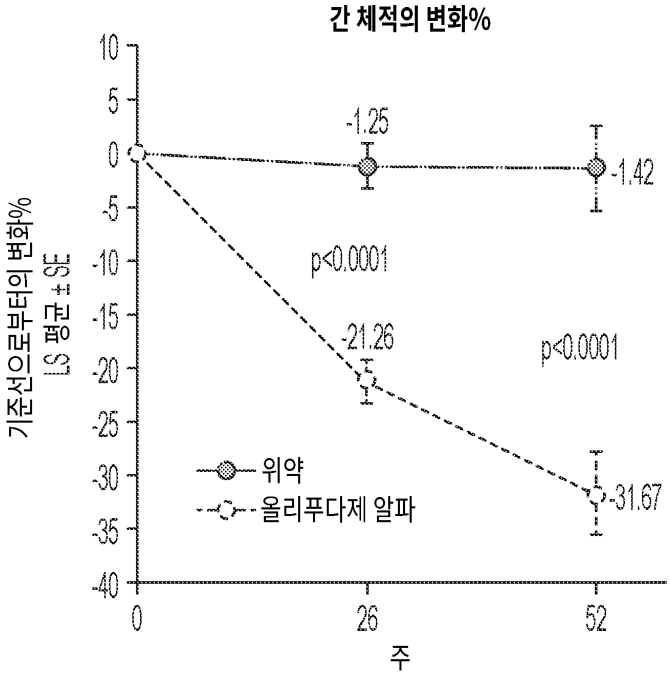
도면16


HRCTILD 점수
(양쪽 폐)
간유리 모양
(양쪽 폐)
LS 평균 점수의 변화
LS 평균 ± SE
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
0
26
52
주
위약
올리푸다제 알파

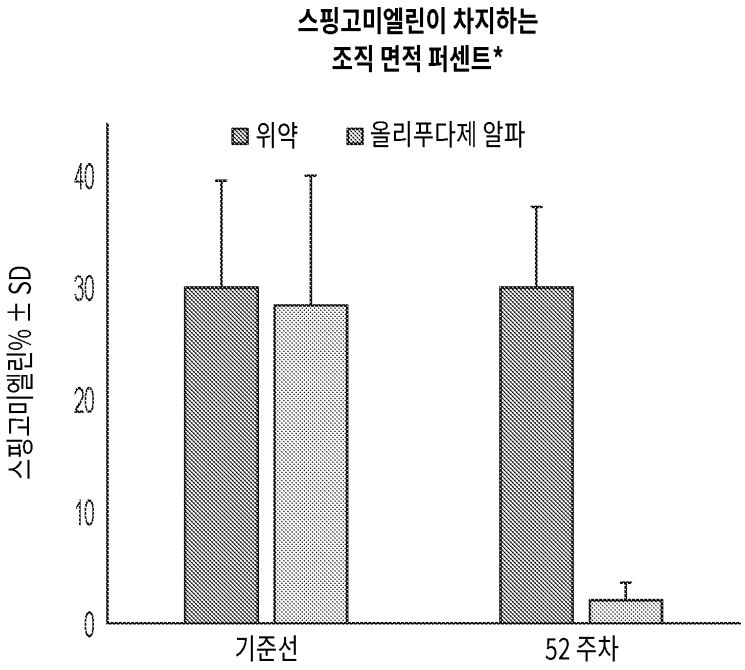
도면17


비장 체적의 변화%
기준선으로부터의 변화%
LS 평균 ± SE
주
0.48
-2.36
-30.84
-39.45
p<0.0001
p<0.0001
위약
올리푸다제 알파
비장비대 관련 점수(SRS)의 변화
기준선으로부터의 변화
LS 평균 ± SE
주
p=0.70

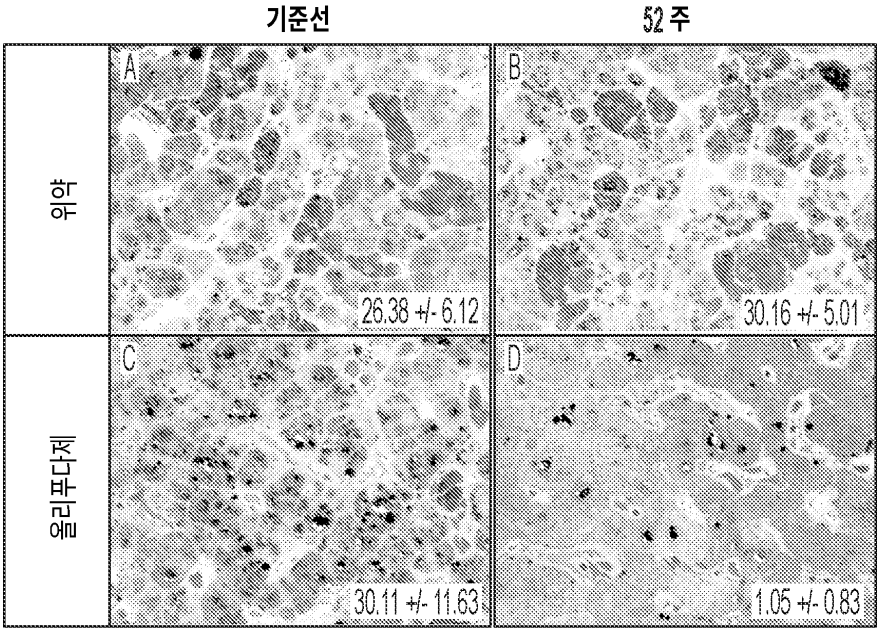
도면18


간 체적의 변화%
기준선으로부터의 변화%
LS 평균 ± SE
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-1.25
-1.42
p<0.0001
-21.26
p<0.0001
-31.67
위약
올리푸다제 알파
0
26
52
주

도면19

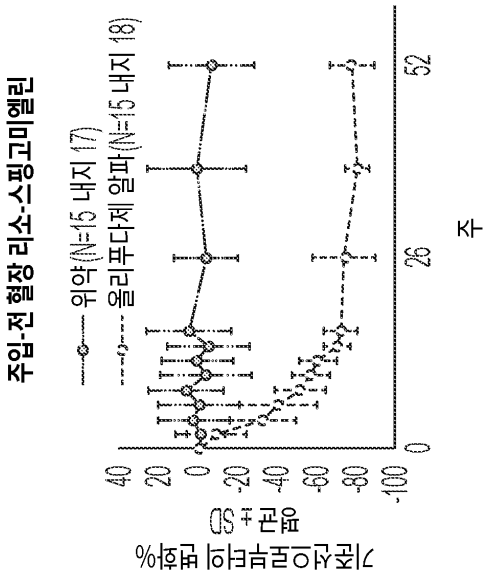

스핑고미엘린이 차지하는
조직 면적 퍼센트*
위약
올리푸다제 알파
스핑고미엘린% ± SD
40
30
20
10
0
기준선
52 주차

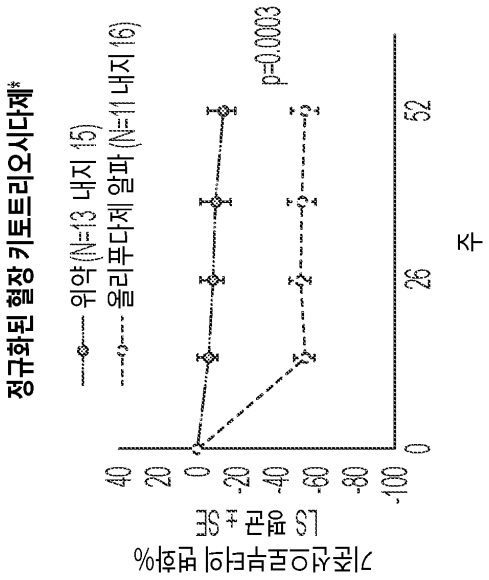
도면20



간 생검의 대표적인 톨루이딘 블루 염색 영상
(스핑고미엘린은 짙은 청색으로 나타남)

도면21


주입-전 혈장 리소-스핑고미엘린
위약 (N=15 내지 17)
올리푸다제 알파 (N=15 내지 18)
기준선으로부터의 변화%
평균 ± SD
주
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
26
52


정규화된 혈장 키토트리오시다제*
위약 (N=13 내지 15)
올리푸다제 알파 (N=11 내지 16)
p=0.0003
기준선으로부터의 변화%
LS 평균 ± SE
주
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
26
52

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.