



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104379596 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201380033337.6

(22)申请日 2013.04.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104379596 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(30)优先权数据  
61/641,105 2012.05.01 US  
13/844,261 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.12.23

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/037656 2013.04.22

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/165732 EN 2013.11.07

(73)专利权人 菲尼克斯公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·艾伦 G·坎廷  
R·哈弗斯托克

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256  
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.  
C07K 14/445(2006.01)

(56)对比文件

WO 2011139718 A1,2011.11.10,  
EP 2385107 A1,2011.11.09,  
Dharmendar Rathore,et al..Role of  
cysteines in Plasmodium falciparum  
circumsporozoite protein: Interactions  
with heparin can rejuvenate inactive  
protein mutants.《PNAS》.2000,第97卷(第15  
期),第8530-8535页.

N. Kolodny,et al..Two-step  
chromatographic purification of  
recombinant Plasmodiumfalciparum  
circumsporozoite protein from Escherichia  
coli.《Journal of Chromatography B》.2001,  
第762卷(第1期),第77-86页.

N. Kolodny,et al..Two-step  
chromatographic purification of  
recombinant Plasmodiumfalciparum  
circumsporozoite protein from Escherichia  
coli.《Journal of Chromatography B》.2001,  
第762卷(第1期),第77-86页.

审查员 高赞

权利要求书4页 说明书95页  
序列表38页 附图32页

(54)发明名称  
用于纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白的方法

(57)摘要

本发明涉及用于以高产率纯化高品质的重组恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)环孢子蛋白的方法。这一方法以高产率提供rCSP而不需要变性和重折叠该蛋白质。本发明克服了本发明领域中先前遇到的障碍,包括rCSP的二聚化、聚集和N-末端降解。本发明提供的方法是可放大的,且可以应用于大的发酵批次。本发明还涉及重组恶性疟原虫环孢子蛋白的稳定液体制剂

及用于稳定地维持rCSP在稳定液体制剂中的方法。



CN 104379596 B

1. 一种用于纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的方法,所述方法包括:

(a) 获得含有重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体的细菌细胞裂解物制剂;

(b) 将步骤(a)的细菌细胞裂解物制剂分离成含有所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体的可溶性部分,和不溶性部分;

(c) 将步骤(b)的可溶性部分中的所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体与可溶性部分中的宿主细胞蛋白质分离;和

(d) 使在步骤(c)中得到的所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体经历优先还原条件,其中所述优先还原条件还原分子间二硫键以分离单体而同时保持各单体的分子内二硫键,其中所述优先还原条件包含轻度还原剂,且所述轻度还原剂是浓度0.01至0.03mM的DTT;

从而获得纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白而不需要蛋白质的变性和重折叠,其中所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白包括最N-末端的半胱氨酸,该最N-末端的半胱氨酸对应于SEQ ID NO:1的Cys25,且其中不超过10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白是二聚化的,和不超过10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白以高分子量聚集体存在。

2. 如权利要求1的方法,进一步包括:

(e) 将步骤(d)中得到的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白与宿主细胞蛋白、N-末端降解的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白和/或其它不需要的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白种类分离。

3. 如权利要求1的方法,其中以10%至75%总体纯化产率获得所述纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白。

4. 如权利要求1的方法,其中所获得的所述纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白质包含至少90%的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白单体。

5. 如权利要求1的方法,其中步骤(c)的所述分离包括色谱,并且其中所述色谱包括阴离子交换色谱和混合模式色谱。

6. 如权利要求5的方法,其中所述混合模式色谱是羟基磷灰石色谱。

7. 如权利要求2的方法,其中步骤(e)的所述分离包括疏水相互作用色谱。

8. 如权利要求1的方法,其中所述优先还原条件还包含解聚剂。

9. 如权利要求8的方法,其中所述解聚剂是尿素、精氨酸、盐酸胍或去垢剂。

10. 如权利要求1的方法,进一步包括制备稳定的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白液体制剂,其中包括将1mg/ml至10mg/ml、1mg/ml至5mg/ml或5mg/ml至10mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白渗滤到包含0.5mM至1.5mM的MTG以及10%至20%的精氨酸的制剂缓冲液中,和存储该稳定的蛋白质制剂,其中所述稳定的液体制剂具有6.0至7.5的pH值,存储温度为3°C至25°C。

11. 如权利要求2的方法,进一步包括制备稳定的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白液体制剂,其包括将1mg/ml至10mg/ml、1mg/ml至5mg/ml或5mg/ml至10mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白渗滤到包含0.5mM至1.5mM的MTG以及10%至20%的精氨酸的制剂缓冲液中,和储存该稳定的蛋白质制剂,其中所述稳定的液体制剂具有6.0至7.5的pH值,存储温度为3°C至25°C。

12. 如权利要求10的方法,其中所述制剂缓冲液包含0.5X或1X的PBS。
13. 如权利要求12的方法,其中所述制剂缓冲液具有6.4至7.2、6.4至7.0、6.6至6.8或6.7的pH值。
14. 如权利要求13的方法,其中所述制剂缓冲液包含1.0mM的MTG、10%至20%的精氨酸、1X的PBS,并且其中所述存储温度为4℃至6℃。
15. 如权利要求10的方法,其中所述稳定的重组恶性疟原虫环孢子蛋白液体制剂含有下列中的至少一种:不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体;不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白高分子量聚集体;不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的变性重组恶性疟原虫环孢子蛋白;和不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白降解产物。
16. 如权利要求1的方法,其中所述的细菌细胞裂解物是从用含有编码重组恶性疟原虫环孢子蛋白的核酸序列的表达载体转化的宿主细胞制备的。
17. 如权利要求16的方法,其中所述宿主细胞是假单胞菌细胞。
18. 如权利要求17的方法,其中所述宿主细胞是假单胞菌属细胞。
19. 如权利要求16的方法,其中由所述核酸序列编码的重组恶性疟原虫环孢子蛋白具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,或与如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。
20. 如权利要求18的方法,其中所述编码重组恶性疟原虫环孢子蛋白的核酸序列与周质分泌信号序列融合。
21. 一种稳定的重组恶性疟原虫环孢子蛋白液体制剂,其在含有0.5至1.5mM的MTG和10%至20%的精氨酸的制剂缓冲液中包含1至5或1至10mg/ml的重组恶性疟原虫环孢子蛋白,其中所述稳定的恶性疟原虫环孢子蛋白液体制剂含有下列中的至少一种:不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体;不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的恶性疟原虫环孢子蛋白高分子量聚集体;不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的变性恶性疟原虫环孢子蛋白;不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的含焦谷氨酸的恶性疟原虫环孢子蛋白种类;和不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过6%、不超过7%、不超过8%、不超过9%或不超过10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白降解产物,且其中所述稳定的液体制剂具有6.0至7.5的pH值,和其中所述存储温度为2℃至8℃。
22. 如权利要求21的稳定的液体制剂,其中所述制剂缓冲液包含0.5X或1X的PBS。
23. 如权利要求22的稳定的液体制剂,其中所述制剂缓冲液6.4至7.2、6.4至7.0、6.6至6.8、6.4、6.7或7.0的pH值。

24. 如权利要求23的稳定的液体制剂,其中所述稳定的液体制剂包含1至5mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白、1.0mM的MTG、10%的精氨酸、1X的PBS,和其中所述存储温度为4℃至6℃。

25. 一种用于在稳定的液体制剂中稳定地维持重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的方法,所述方法包括提供权利要求24的稳定的液体制剂,其中所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白在3℃至25℃的温度下稳定地维持至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天或至少30天。

26. 如权利要求1的方法,进一步包括将纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白稳定地维持在稳定的液体制剂中,该方法包括提供在0.5X或1X的PBS中含有1至5、1至10mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白,0.5至1.5mM的MTG以及1%至20%的精氨酸的制剂,pH 6.0至7.5,其中所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白在3℃至25℃的温度下稳定地维持至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天或至少30天。

27. 如权利要求2的方法,进一步包括将纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白稳定地维持在稳定的液体制剂中,该方法包括提供在1X的PBS中含有1至5、1至10mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白,0.5至1.5mM的MTG以及10%至20%的精氨酸的制剂,pH 6.4至7.2,其中该重组恶性疟原虫环子孢子蛋白在3℃至25℃的温度下稳定地维持至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天或至少30天。

28. 如权利要求10-15和25-27任一项的方法或如权利要求21-23任一项的稳定的液体制剂,其中所述稳定的液体制剂包含在1X的PBS中的1.0mM的MTG和10%的精氨酸,pH为6.4至7.0,其中该重组恶性疟原虫环子孢子蛋白在3℃至5℃的温度下稳定地维持至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天或至少30天。

29. 如权利要求25-27任一项的方法,其中重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的稳定维持通过制剂中总重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的量、与对照相比时制剂中总重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的相对百分差异或与对照相比时重组恶性疟原虫环子孢子蛋白纯度的相对百分差异指示。

30. 如权利要求29的方法,其中重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的稳定维持通过制剂中70%至95%的总重组恶性疟原虫环子孢子蛋白量,或通过与对照相比时-5%至5%、-4%至4%、-3%至3%、-2%至2%、-2%至1%、-2%至0.5%、-2%至0%或0%至2%的制剂中总重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的相对百分差异或重组恶性疟原虫环子孢子蛋白纯度的相对百分差异指示。

31. 如权利要求1的方法,其中所获得的所述纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的N-末端包括与SEQ ID NO:1所示位置24处的谷氨酰胺对应的谷氨酰胺、与SEQ ID NO:1所示位



置23处的酪氨酸对应的酪氨酸、与SEQ ID NO:1所示位置22处的谷氨酸对应的谷氨酸和/或与SEQ ID NO:1所示位置21处的谷氨酰胺对应的谷氨酰胺。

## 用于纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的方法

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年5月1日提交的61/641,105号美国临时专利申请的优先权;且是2013年3月15日提交的13/844,261号美国专利申请的部分继续申请,其每白的全文通过引用在此引入。

### [0003] 政府支持

[0004] 本发明是利用由美国国立卫生研究院微生物学和传染病研究所(Division of Microbiology and Infectious Diseases/National Institute of Allergy and Infectious Diseases)授予的合同号AI-N01-054210的政府支持获得的。政府对本发明具有一定的权利。

### 发明领域

[0005] 本发明属于蛋白质纯化领域,特别是重组表达的恶性疟原虫环子孢子蛋白的纯化。

### [0006] 发明背景

[0007] 疟疾是由疟原虫属的寄生虫引起的。根据疾病控制中心报告,在非洲作为传染病致死的最主要原因,疟疾在HIV/AIDS之后位居第二。它在全世界范围内位居第五,在呼吸道感染、HIV/AIDS、腹泻病和结核病之后。恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*),至少11种已知侵袭人类的疟原虫属寄生虫之一,引起其特征在于寄生虫隔离在重要器官及深部组织中(在此处其可以逃避免疫系统)的特别严重的感染。

[0008] 尚无有效的疟疾疫苗可用。最近的策略靶向于恶性疟原虫环子孢子蛋白(CSP),其对于寄生虫的发病机制是关键。目前,由CSP的一部分组成的被称为RTS,S(GlaxoSmithKline)的疫苗处于三期临床试验中。CSP是一种蛋白质单体,其可以被概括地描述为具有三个区域—N-末端区域、中央重复区域和C-末端区域。N-和C-末端区域含有对寄生虫侵袭重要的关键保护区域,以及中央区域含有高度保守的免疫显性四肽重复序列。该疫苗RTS,S不包括CSP的N-末端区域。它是由一部分CSP中央重复和C-末端区域组成,连接乙型肝炎表面抗原。表明CSP的N-末端区域是免疫原性的最近报告提出,利用具有N-末端区域的CSP分子的疫苗策略将是具有优势的。

[0009] 开发生产规模纯化工艺以制备满足疫苗研究和生产所需要的数量的重组CSP存在挑战。CSP的N-末端区域非常容易降解。此外,CSP由于形成共价分子间二硫键二聚化,其涉及在单体N-末端附近的游离半胱氨酸。CSP也形成较高分子量的聚集体。目前的纯化方案提供了缺乏N-末端区域的重组CSP单体,或者它们产生低产量的完整CSP。变性以消除二聚体和聚集体需要重折叠,这由于CSP的C-末端区域中涉及四个半胱氨酸残基的两个二硫键的存在而复杂化。这些二硫键对于C-末端保护区域的结构和功能是至关重要的;这些二硫键的破坏已经显示破坏了CSP结合肝细胞的能力。此外,额外的变性和重折叠步骤是繁琐的、成本高、降低产率,并对用于大批量发酵使用的放大造成挑战。因此,需要用于以高收率获得高品质的重组CSP的可放大的纯化方法。

## [0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及一种用于纯化在细菌宿主细胞表达系统中产生的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白(rCSP)的方法。此方法以高产率提供rCSP而不需要蛋白质的变性和重折叠。本发明克服了以前在该领域所遇到的障碍,包括rCSP的二聚化、聚集和N-末端降解。由本发明提供的方法是可放大的,并且可以适用于大批量发酵。本发明还涉及重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的稳定的液体制剂,以及在稳定的液体制剂中稳定地维持rCSP的方法。

[0012] 在实施方式中,本发明提供了用于纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的方法,所述方法包括:(a)获得含有重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体的细菌细胞裂解物制剂;(b)将步骤(a)的细菌细胞裂解物制剂分离成含有恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体的可溶性部分,和不溶性部分;(c)将步骤(b)的可溶性部分中的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体与可溶性部分中的宿主细胞蛋白质分离;和(d)使在步骤(c)中得到的所述重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体经历优先还原条件;从而获得纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白。

[0013] 在相关的实施方式中,以大约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、10%至约55%、约10%至约50%、约10%至约45%、约10%至约40%、约10%至约35%、约10%至约30%、约10%至约25%、约10%至约20%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约20%至约60%、约20%至约55%、约20%至约50%、约20%至约45%、约20%至约40%、约20%至约35%、约20%至约30%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约25%至约55%、约25%至约50%、约25%至约45%、约25%至约40%、约25%至约35%、约25%至约30%、约30%至约75%、约30%至约70%、约30%至约65%、约30%至约60%、约30%至约55%、约30%至约50%、约30%至约45%或约30%至约40%的总体纯化产率得到纯化的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白在N-末端降解。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚化。在实施方式中,不超过约5%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白以高分子量聚集体存在。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白变性。在相关实施方式中,所得到的纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白质包含至少约90%的恶性疟原虫环子孢子蛋白单体。

[0014] 在本发明的实施方式中,细菌细胞裂解物是假单胞菌(Pseudomonad)细胞裂解物。在相关的实施方式中,假单胞菌细胞是假单胞菌属(Pseudomonas)细胞,和在其它相关的实施方式中,该假单胞菌属细胞是荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)。

[0015] 在实施方式中,上述步骤(b)的分离包含盘栈离心(disk-stack centrifugation)和/或深度过滤。步骤(c)的分离可以包括色谱。在实施方式中,色谱法包括下列的一种或多种:阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、亲和色谱和混合模式色谱。设想使用羟磷灰石色谱作为混合模式色谱。在某些实施方式中,步骤(b)的分离包括盘栈离心和深度过滤,和步骤(d)的分离包括阴离子交换色谱和混合模式色谱。

[0016] 在本发明的实施方式中,优先还原条件包含DTT、半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油、巯基乙酸盐、二硫苏糖醇(dithiothreitol)、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇(B-巯基乙醇)、TCEP-HCl(纯结晶三-(2-羧基乙基)膦酸盐)或2-巯基乙胺-HCl(2-

MEA)。在某些相关的实施方式中,优先还原条件包含浓度约0.01至约0.03mM的DTT。缓冲液交换可以包含使用具有约4kDa至约8kDa的孔径的膜进行的切向流过滤。在实施方式中,优先还原条件包含符合美国药典委员会(Rockville,MD)的标准(如在United States Pharmacopeia-National Formulary (USP-NF)中公布的)或在美国以外的国家的类似标准(例如,如在国际药典(世界卫生组织)中公布的)的成分。

[0017] 所述的方法可放大至包含约1克至约2000克rCSP的细菌细胞裂解物制剂。在相关实施方式中,细菌裂解物制剂中的rCSP的量为约1克至约2000克。

[0018] 本发明进一步涉及用于纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白的方法,该方法包括:(a)获得细菌宿主细胞的培养物,其中所述细菌宿主细胞用包含编码恶性疟原虫环孢子蛋白的核酸序列的表达载体转化;(b)培养细菌宿主细胞的培养物,由此从表达载体表达恶性疟原虫环孢子蛋白;(c)破坏在步骤(b)中培养的细菌宿主细胞的培养物的细菌宿主细胞,以产生细菌细胞裂解物制剂,其中所述细菌细胞裂解物制剂包含恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体;(d)使步骤(c)的细菌细胞裂解物制剂分离成含有恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体的可溶性部分,和不溶性部分;(e)将步骤(d)的可溶性部分中的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体与宿主细胞蛋白质分离;(f)使在步骤(e)中得到的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体经历优先还原条件,从而获得恶性疟原虫环孢子蛋白单体;及(g)通过缓冲液交换除去在步骤(f)的优先还原条件中使用的还原试剂;从而获得纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。

[0019] 在相关的实施方式中,以大约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约30%至约75%、约30%至约70%、约30%至约65%或约30%至约60%的总体纯化产率获得纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白在N-末端降解。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚化。在实施方式中,不超过约5%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白以高分子量聚集体存在。在实施方式中,不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白变性。在相关实施方式中,所获得的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白质包含至少约90%的恶性疟原虫环孢子蛋白单体。

[0020] 在本发明的实施方式中,细菌细胞裂解物是假单胞菌细胞裂解物。在相关的实施方式中,假单胞菌细胞是假单胞菌属细胞,和在进一步的相关实施方式中,该假单胞菌属细胞是荧光假单胞菌。在某些实施方式中,编码恶性疟原虫环孢子蛋白的核酸序列与周质分泌信号序列融合。该周质分泌信号序列可以是荧光假单胞菌分泌信号序列,例如,LAO、pbp、pbpA20V或cupA2。设想任何CSP的表达,如本文进一步所描述的。在某些实施方式中,rCSP是由核酸序列编码的,其具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,或与如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少具有90%同一性的氨基酸序列。

[0021] 在实施方式中,上述步骤(d)的分离包括盘栈离心和/或深度过滤。步骤(e)的分离可以包括色谱。在实施方式中,色谱法包括下列的一种或多种:阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、亲和色谱和混合模式色谱。设想使用羟磷灰石色谱作为混合模式色谱。在某些实施方式中,步骤(d)的分离包括盘栈离心和/或深度过滤,

和步骤(e)的分离包括阴离子交换色谱法和混合模式色谱。

[0022] 在本发明的实施方式中,优先还原条件包含DTT、半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油、巯基乙酸盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇(B-巯基乙醇)、TCEP-HCl(纯结晶三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐)或2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)。在某些相关的实施方式中,优先还原条件包含浓度约0.010至约0.030mM的DTT。缓冲液交换可以包含使用具有约4kDa至约8kDa的孔径的膜进行的切向流过滤。

[0023] 所述的方法可放大至包含约1克至约2000克rCSP的细菌细胞裂解物制剂。在相关实施方式中,细菌裂解物制剂中的rCSP的量为约1克至约2000克。在本发明的实施方式中,在步骤(b)中培养的细菌宿主细胞的培养物是约10升到约500升。

[0024] 本发明提供了以下内容:

[0025] 1.一种用于纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白的方法,所述方法包括:(a)获得含有重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体的细菌细胞裂解物制剂;(b)将步骤(a)的细菌细胞裂解物制剂分离成含有重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体的可溶性部分,和不溶性部分;(c)将步骤(b)的可溶性部分中的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体与可溶性部分中的宿主细胞蛋白质分离;和(d)使在步骤(c)中得到的所述重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体经历进行优先还原条件,以获得重组恶性疟原虫环孢子蛋白;从而获得纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。

[0026] 2.根据1所述的方法,进一步包括:(e)将步骤(d)中得到的重组恶性疟原虫环孢子蛋白与宿主细胞蛋白、N-末端降解的rCSP和/或其它不需要的rCSP种类分离。

[0027] 3.如1或2所述的方法,其中以约10%至约75%总体纯化产率获得该纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。

[0028] 4.根据1-3中任一项所述的方法,其中以约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约60%、约10%至约50%、约10%至约40%、约10%至约30%、约20%至约75%、约20%至约50%、约20%至约40%或约20%至约30%的总体纯化产率获得纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。

[0029] 5.根据1-4中任一项所述的方法,其中不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白在N-末端降解。

[0030] 6.根据1-5中任一项所述的方法,其中不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚化。

[0031] 7.根据1-6中任一项所述的方法,其中不超过约5%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白以高分子量聚集体存。

[0032] 8.根据1-7中任一项所述的方法,其中不超过约10%的所得到的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白变性。

[0033] 9.根据1-8中任一项所述的方法,其中所获得的纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白质包含至少约90%的恶性疟原虫环孢子蛋白单体。

[0034] 10.根据1-9中任一项所述的方法,其中所述细菌细胞裂解物是假单胞菌细胞裂解物。

[0035] 11.根据10所述的方法,其中所述假单胞菌细胞是假单胞菌属细胞。

[0036] 12.根据11所述的方法,其中所述假单胞菌属细胞是荧光假单胞菌。

- [0037] 13. 根据1-12中任一项所述的方法,其中步骤(b)的分离包括盘栈离心。
- [0038] 14. 根据1-13中任一项所述的方法,其中步骤(b)的分离包括深度过滤。
- [0039] 15. 根据1-14中任一项所述的方法,其中步骤(c)的分离包括色谱法,并且其中所述色谱法包括阴离子交换色谱和混合模式色谱。
- [0040] 16. 根据1-15中任一项所述的方法,其中步骤(c)的分离包括混合模式色谱,并且其中所述混合模式色谱是羟磷灰石色谱。
- [0041] 17. 根据2-16中任一项所述的方法,其中步骤(e)的分离包括疏水相互作用色谱。
- [0042] 18. 根据1-17中任一项所述的方法,其中所述优先还原条件包含轻度还原剂。
- [0043] 19. 根据1-18中任一项所述的方法,其中所述轻度还原剂是DTT、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油(MTG)、巯基乙酸盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇(B-巯基乙醇)、TCEP-HCl(纯结晶三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐)或2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)。
- [0044] 20. 根据19所述的方法,其中所述轻度还原剂是DTT、MTG、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、巯基乙酸或半胱氨酸。
- [0045] 21. 根据20所述的方法,其中所述轻度还原剂是约0.01至约0.03mM浓度的DTT或约0.5mM至约1.5mM浓度的MTG。
- [0046] 22. 根据1-21中任一项所述的方法,其中所述优先还原条件进一步包含解聚剂(disaggregating agent)。
- [0047] 23. 根据22所述的方法,其中所述优先还原条件进一步包含的解聚剂是尿素、精氨酸、盐酸胍或去垢剂。
- [0048] 24. 根据23所述的方法,其中所述解聚剂为约1.5至2.5M的尿素。
- [0049] 25. 根据1-24中任一项所述的方法,其中所述轻度还原条件包含约0.05至约1mM的MTG和约2M的尿素。
- [0050] 26. 根据1-25中任一项所述的方法,进一步包括制备稳定的重组恶性疟原虫环孢子蛋白液体制剂,其包括将约1mg/ml至约50mg/ml、约1mg/ml至约25mg/ml、约1mg/ml至约10mg/ml、约1mg/ml至约5mg/ml、约5mg/ml至约50mg/ml、约5mg/ml至约25mg/ml或约5mg/ml至约10mg/ml的重组恶性疟原虫环孢子蛋白渗滤到包含约0.5mM至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸的制剂缓冲液中。
- [0051] 27. 根据26所述的方法,其中所述制剂缓冲液包含0.5X或1X的PBS。
- [0052] 28. 根据26或27所述的方法,其中所述制剂缓冲液具有约6.0至约7.5、约6.4至约7.2、约6.4至约7.0、约6.6至约6.8或约6.7的pH值。
- [0053] 29. 根据26-28中任一项所述的方法,包括约4°C至约15°C、约4°C至约10°C、约4°C至约9°C、约4°C至约8°C、约4°C至约7°C、约4°C至约6°C、约4°C至约5°C、约5°C至约10°C、约5°C至约9°C、约5°C至约8°C、约5°C至约7°C或约5°C至约6°C的存储温度。
- [0054] 30. 根据26-29中任一项所述的方法,其中所述制剂缓冲液包含约1.0mM的MTG、约10%至约20%的精氨酸、1X的PBS,具有约6.4至约7.0的pH,并且其中所述的存储温度为约4°C至约6°C。
- [0055] 31. 根据26-30中任一项所述的方法,其中所述稳定的重组恶性疟原虫环孢子蛋白液体制剂含有下列中的至少一种:不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约

4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白二聚体；不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白高分子量聚集体；不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的变性重组恶性疟原虫环子孢子蛋白；不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的含焦谷氨酸的恶性疟原虫环子孢子蛋白种类；和不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白降解产物。

[0056] 32. 根据1-31中任一项所述的方法，其中该方法可放大至包含约1克至约2000克rCSP的细菌细胞裂解物制剂。

[0057] 33. 根据1-32中任一项所述的方法，其中细菌裂解物制剂中的rCSP的量为约1克至约2000克。

[0058] 34. 根据1-33中任一项所述的方法，其中该细菌细胞裂解物是从用包含编码重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的核酸序列的表达载体转化的宿主细胞制备的。

[0059] 35. 根据1-34中任一项所述的方法，其中假单胞菌细胞是假单胞菌属细胞。

[0060] 36. 根据35所述的方法，其中所述假单胞菌属细胞是荧光假单胞菌。

[0061] 37. 根据34-36中任一项所述的方法，其中所述由核酸序列编码的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列，或与如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0062] 38. 根据36或37所述的方法，其中所述荧光假单胞菌细胞是具有基因型  $\Delta$  pyrF、lacIQ和  $\Delta$  htpX的PyrF产生宿主菌株。

[0063] 39. 根据34-38中任一项所述的方法，其中编码重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的核酸序列与周质分泌信号序列融合。

[0064] 40. 根据39所述的方法，其中所述周质分泌信号序列是荧光假单胞菌分泌信号序列。

[0065] 41. 根据39所述的方法，其中所述荧光假单胞菌周质分泌信号序列是LA0、pbp、pbpA20V或cupA2。

[0066] 42. 根据41所述的方法，其中所述荧光假单胞菌周质分泌信号序列是LA0。

[0067] 43. 一种稳定的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的液体制剂，其在含有约0.5至约1.5mM的MTG和约10%至约20%的精氨酸的制剂缓冲液中包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的重组恶性疟原虫环子孢子蛋白。

[0068] 44. 根据43所述的稳定的液体制剂，其中所述制剂缓冲液包含0.5X或1X的PBS。

[0069] 45. 根据43或44所述的稳定的液体制剂，其中所述制剂缓冲液具有约6.0至约7.5、6.4至约7.2、约6.4至约7.0、约6.6至约6.8、约6.4、约6.7或约7.0的pH值。

[0070] 46. 根据43-45中任一项所述的稳定的液体制剂，包括约4°C至约15°C、约4°C至约10°C、约4°C至约9°C、约4°C至约8°C、约4°C至约7°C、约4°C至约6°C、约4°C至约5°C、约5°C至约10°C、约5°C至约9°C、约5°C至约8°C、约5°C至约7°C或约5°C至约6°C的存储温度。

[0071] 47. 根据43-46中任一项所述的稳定的液体制剂, 包含约1至约5mg/ml的rCSP、约1.0mM的MTG、约10%的精氨酸、1X的PBS, 具有约6.0至约7.5的pH值, 和其中所述存储温度为约4°C至约6°C。

[0072] 48. 根据43-47中任一项所述的稳定的液体制剂, 其中该稳定的液体制剂含有下列中的至少一种: 不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体; 不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白高分子量聚集体; 和不超过约1%、不超过约2%、不超过约3%、不超过约4%、不超过约5%、不超过约6%、不超过约7%、不超过约8%、不超过约9%或不超过约10%的重组恶性疟原虫环孢子蛋白的降解产物。

[0073] 49. 一种用于在稳定的液体制剂中稳定地维持rCSP的方法, 所述方法包括提供在0.5X或1X的PBS中包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP, 约0.5至约1.5mM的MTG以及约1%至约20%的精氨酸的制剂, pH约6.0至约7.5, 其中所述rCSP在约3°C至约25°C的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天, 至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0074] 50. 一种用于在稳定的液体制剂中稳定地维持rCSP的方法, 所述方法包括提供在1X的PBS中包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP, 约0.5至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸的制剂, pH约6.4至约7.2, 其中所述rCSP在约3°C至约25°C的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天, 至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0075] 51. 一种用于在稳定的液体制剂中稳定地维持rCSP的方法, 所述方法包括提供在1X的PBS中包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP, 约0.5至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸的制剂, pH约6.4至约7.0, 其中所述rCSP在约3°C至约25°C的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天, 至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0076] 52. 根据1-42中任一项所述的方法, 进一步包括将纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白稳定地维持在稳定的液体制剂中, 其中该方法包括提供在0.5X或1X的PBS中含有约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP, 约0.5至约1.5mM的MTG以及约1%至约20%的精氨酸的制剂, pH约6.0至约7.5, 其中所述rCSP在约3°C



至约25℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天、至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0077] 53. 根据52所述的方法,其中所述制剂含有约1.0mM的MTG和约10%的精氨酸,在1X的PBS中,pH约6.4至7.0,其中该rCSP在约3℃至约5℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0078] 54. 根据49至53中任一项的方法,其中rCSP的稳定维持通过检测到的总rCSP的量、与对照相比时总rCSP的相对百分差异或与对照相比时rCSP纯度的相对百分比差异指示。

[0079] 55. 根据54所述的方法,其中rCSP的稳定维持通过检测的约70%至约95%的总rCSP的量,通过是与对照相比时约-5%至约5%、约-4%至约4%、约-3%至约3%、约-2%至约2%、约-2%至约1%、约-2%至约0.5%、约-2%至约0%或约0%至约2%总rCSP的相对百分差异或rCSP纯度的相对百分差异指示。

[0080] 56. 根据54或55所述的方法,其中所述总rCSP是rCSP单体的量度。

[0081] 57. 根据54至56中任一项所述的方法,其中所述对照是零时间点或贮存于-80℃的样品。

[0082] 58. 根据54-57中任一项所述的方法,其中检测的总rCSP的量是约70%至约95%、约70%至约90%、约70%至约85%、约70%至约80%、约75%至约95%、约75%至约90%、约75%至约85%、约80%至约95%、约80%至约90%、约85%至约95%、约72%至约92%、约70%、约11%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%。

[0083] 59. 根据1-42中任一项所述的方法,包括在步骤(c)之前冷冻和解冻所述裂解物。

[0084] 通过引用结合

[0085] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都通过引用引入,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体地和单独地表明引入本文作为参考。

[0086] 附图简要说明

[0087] 本发明的新颖特征将根据所附的权利要求书的特征详细描述。通过参考下面的其中利用本发明的原理及附图的阐述说明性实施方式的详细描述将获得对本发明的特征和优点的更好的理解。

[0088] 图1. 恶性疟原虫CSP蛋白质结构。本示意图显示了GenBank CAB38998中所示的蛋白质中的结构域,和在残基25、334、338、369和374处的半胱氨酸(各通过C标示)。

[0089] 图2. 恶性疟原虫CSP氨基酸序列。A. 恶性疟原虫3D7CS氨基酸序列;GenBank登记号CAB38998 (SEQ ID NO:1),具有推定的原始分泌前导序列和GPI锚。B. 胞质CSP的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2),具有N-末端甲硫氨酸,并且不含原始前导序列和GPI锚,显示为非限制性的

实例。C. 周质CSP的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3), 不含天然前导序列、N-末端蛋氨酸和GPI锚, 显示为非限制性的实例。

[0090] 图3. 恶性疟原虫CSP核酸序列。A. 恶性疟原虫3D7CS核苷酸序列; GenBank登记号XM\_001351086.1 (SEQ ID NO:4)。B. 优化的核苷酸序列 (SEQ ID NO:5), 其编码与周质分泌前导序列融合的SEQ ID NO:3的CSP氨基酸序列, 显示为非限制性的实例。C. 优化的核苷酸序列 (SEQ ID NO:6), 其编码与周质分泌前导序列融合的CSP, 显示为非限制性的实例。

[0091] 图4. 添加不同量的还原剂后二聚体rCSP的RP-HPLC分析。A. DTT浓度为0.5mM、0.1mM、0.03mM和无DTT。B. DTT浓度为0.01mM、0.003mM和无DTT。

[0092] 图5. 解聚的rCSP的RP-HPLC分析。A. 用2M尿素和不同量的DTT在pH 7.2下处理。B. 用2M尿素和不同量的DTT在pH 8.0下处理。

[0093] 图6. 轻度还原处理前和后及最终的缓冲液交换的rCSP RP-HPLC分析。A. 轻度还原处理前批次533-241的RP-HPLC分析。B. 轻度还原处理和最终TFF缓冲液交换后批次533-241的RP-HPLC分析。C. 内部参考标准533-191的RP-HPLC。

[0094] 图7. 轻度还原处理后和最终的缓冲液交换的rCSP SE-HPLC分析。A. 轻度还原处理和最终TFF缓冲液交换后批次533-241的SE-HPLC分析。B. 内部参考标准533-191的SE-HPLC。

[0095] 图8. 二聚体形式的rCSP的过程中RP-HPLC检测。A. 用疏水性相互作用色谱法分离rCSP单体和二聚体。B. 单体和二聚体rCSP级分的SDS-CGE分析 (还原的)。C. 单体和二聚体rCSP级分的SDS-CGE分析 (非还原的)。D. 单体和二聚体rCSP池的RP-HPLC分析。

[0096] 图9. 用于rCSP的具有多角度激光散射的尺寸排阻HPLC法。A. 具有MALS检测的rCSP内部参考标准 (批次533-191) 的SE-HPLC色谱图。B. 具有MALS检测的牛血清白蛋白 (BSA) 标准的SE-HPLC色谱图。

[0097] 图10. 聚集的和二聚体形式的rCSP的尺寸排阻HPLC分析。A. 离心浓缩后rCSP样品的SE-HPLC色谱图。B. 聚集的批次533-128的SE-HPLC色谱图。

[0098] 图11. 用于肝素结合的rCSP的生物膜干涉技术 (biolayer interferometry) (BLI) 分析。A. 肝素生物传感器配置。B. 对于各种rCSP制剂的肝素结合的BLI分析。C. rCSP结合率的比较。

[0099] 图12. rCSP的毛细管等电聚焦 (cIEF) 分析。在2M尿素和10mM的DTT存在下孵育样品1小时, 然后浓缩至约1.5mg/ml。A. rCSP 533-191内部参考的分析。B. cIEF精度评估; 批次533-191的五次重复注射的电泳图覆盖。

[0100] 图13. rCSP的远UV圆二色性分析。仪器: JASCO815; 温度 = 20°C; 扫描速度 = 100nm/分钟; D.I.T. = 1秒; 数据间距 = 1nm; 累积 = 5。A. 533-191内部参考标准的CD谱。B. 软件分析: 输入谱对预测谱。

[0101] 图14. 制剂533-191通过LC-MS的完整质量分析, 还原的 (A-C) 和非还原的 (D-F)。A. 还原样品的色谱图 (UV, 上图; 和MS TIC (质谱总离子流, 下图))。B. 来自18.1分钟的目标峰区域的总和质谱 (summed mass spectra)。C. 源自18.1分钟区域的总和质谱的解卷积谱。D. 非还原的样品的色谱图。E. 来自17.8分钟的目标峰区域的总和质谱。F. 源自17.8分钟区域的总和质谱得到的解卷积谱。分别对于还原和非还原的样品所观察到的和理论MW之间的差值 ( $\delta$ MW) 为1和4Da。

[0102] 图15. 烷基化的533样品通过LC-MS的完整质量分析。显示了烷基化的样品的解卷

积谱。A. 与具有一个半胱氨酸烷基化的533的理论MW相比,观察到烷基化非还原533-191具有6.0Da的 $\delta$ 。B. 与具有五个半胱氨酸烷基化的533的理论MW相比,观察到还原和烷基化的533-191具有3.9Da的 $\delta$ 。存在与含4个半胱氨酸烷基的533相关的另外的种类,并且以~43%的总丰度存在。这个观察最有可能是由于不完全烷基化。

[0103] 图16. 通过非还原Glu-C消化然后LC-MS/MS分析533-191的N端半胱氨酸。A. 将所得的数据如在方法章节中描述的用BiopharmaLynx进行处理。带图心MS色谱图的部分放大显示识别Glu-C肽E2\* (包含第一、最N-末端的半胱氨酸C1) (SEQ ID NO:110), 且它被烷基化(由\*表示)。B. 在相同的带图心MS色谱图的不同部分放大显示识别Glu-C产生的二硫键键合E1-E2:E1-E2二肽(核心序列公开为SEQ ID NO:111)。E1-E2表示在肽内谷氨酸残基处缺失的切割。

[0104] 图17. 还原的和烷基化的533-128的肽图。A. Asp-N消化的BiopharmaLynx分析的序列覆盖率(SEQ ID NO:3) (75.4%)。B. 胰蛋白酶消化的BiopharmaLynx分析的序列(SEQ ID NO:3)覆盖率(56.9%)。紫色文字的氨基酸表示确认。浅灰色文字表示未确认。青绿色突出显示的半胱氨酸表示确认的体外半胱氨酸烷基化残基。黄色突出显示的N/Q残基表示确认的脱酰胺。搜索这些脱酰胺的可变性,从而单单确认并不能说明这些残基各自以什么水平脱酰胺。实际上有些可能是假的确认,且需要进一步分析以证实这些脱酰胺。C. 表明与ASP-N消化确认的肽相关的峰的LC-MS色谱图。D. 表明与ASP-N消化确认的肽相关的峰的LC-MS色谱图LC-MS色谱图。

[0105] 图18. 未通过BiopharmaLynx软件确认的大的肽的人工确认。使用MaxEnt1对来自各自峰的MS谱进行加和并去卷积。A. 来自29.1分钟峰的去卷积谱。对于肽179-267(氨基酸),所观察到的MW与理论MW(8,971.15Da)相差0.9Da。B. 来自30.5分钟峰的去卷积谱。对于肽107-178(氨基酸),所观察到的MW与理论MW(7,178.19Da)相差3.8Da。

[0106] 图19. 批次533-406的TMAE HiCap色谱法。A. 色谱图和柱运行条件。B. 级分的SDS-CGE凝胶样图像分析。

[0107] 图20. 用于批次533-407的TMAE HiCap色谱法。A. 色谱图和柱运行条件。B. 级分的SDS-CGE凝胶样图像分析。

[0108] 图21. 用于批次533-406的陶瓷HA I型色谱法。A. 色谱图和柱运行条件。B. 级分的SDS-CGE凝胶样图像分析。

[0109] 图22. 用于批次533-407的陶瓷HA I型色谱法。A. 色谱图和柱运行条件。B. 级分的SDS-CGE凝胶样图像分析。

[0110] 图23. 集成纯化运行的SDS-PAGE。通过SDS-PAGE分析重组CSP批次533-406和533-407,使用具有MOPS缓冲液的10%Bis-Tris凝胶;MW=分子量标记;L=柱加载;Elut=柱洗脱样品;Final=最终纯化的rCSP。

[0111] 图24. 集成纯化运行的Western印迹分析。通过Western印迹分析重组的CSP批次533-406、533-407和533-191,使用构象特异性的4C2抗体。

[0112] 图25. rCSP的尺寸排阻HPLC分析。A. rCSP批次533-406的SE-HPLC色谱图。B. rCSP批次533-407的SE-HPLC色谱图。C. rCSP参考533-191的SE-HPLC色谱图。

[0113] 图26. rCSP的RP-HPLC分析。A. rCSP批次533-406的RP-HPLC色谱图。B. rCSP批次533-407的RP-HPLC色谱图。C. rCSP参考533-191的RP-HPLC色谱图。

[0114] 图27.rCSP的完整质量分析。A.rCSP批次533-406的解卷积谱。B.rCSP批次533-407的解卷积谱。C.rCSP参考533-191的解卷积谱。

[0115] 图28rCSP的肽图分析。A.rCSP批次533-406的LC/MS GluC肽图谱。B.rCSP批次533-407的LC/MS GluC肽图谱。C.rCSP参考533-191的LC/MS GluC肽图谱。

[0116] 图29.rCSP的毛细管等电聚焦(cIEF)分析。A.rCSP批次533-406的cIEF分析。B.rCSP批次533-407的cIEF分析。C.rCSP参考533-191的cIEF分析。

[0117] 图30.rCSP的远UV圆二色性分析和rCSP的固有荧光分析。A.rCSP的远UV圆二色性分析。仪器:JASC0815;温度=20℃;扫描速度=100nm/分钟;D.I.T.=1秒;数据间距=0.1nm;累积=5;如所示的533-191(内部参考)、533-406和533-407的CD谱。B.rCSP的固有荧光分析。测量模式:Em.Spectrum;灵敏度=740V;D.I.T.=1秒;带宽(Ex)2.00=nm;带宽(Em)=10nm;Ex.波长=280nm;测量范围=295-395nm;数据间距=1nm;快门控制=自动;CD检测器=PMT;累积=3;溶剂=PBS;浓度166(重量/体积)%;温度增量20℃。具有25的卷积宽度的Savitzky-Golay滤波应用于谱。如所示的533-191(内部参考)、533-406和533-407的荧光谱。

[0118] 图31.rCSP的RP-HPLC分析。1mg/ml的rCSP的RP-HPLC,在4℃下,pH为7.5,在指示组1-3峰的时间0处。pE=含焦谷氨酸的肩。

[0119] 图32.冷冻后保持时间对高相对分子质量种类的影响。来自Engineering Run 1浆料和Process Run Through浆料的冷冻和解冻整体滤液显示出对冷冻-解冻后保持时间(T)的梯带的影响。A.解冻后不保持的样品(T=0)。上面三个箭头指示的高分子量种类“梯带”。下面的箭头指示的rCSP。B.解冻后在室温下保持2.5小时的样品(T=2.5)。C.解冻后在室温下保持6小时的样品(T=6)。所有图:道1=MW标志物;道2=PRT(-252)2微米过滤前;道3=PRT(-445)2微米过滤后;道3=ER1(-445)2微米过滤后。

#### [0120] 发明详述

[0121] 本发明提供了一种用于纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白(CSP)的可放大的新颖的方法。在本发明的方法中,以高产率得到rCSP而不需要蛋白质的变性和重折叠。这一成就至少由于以下原因而显著:全长的CSP倾向于形成二聚体和更高的聚集体,且CSP单体的N-末端通常降解。二聚化与单体的N-末端附近未配对半胱氨酸残基的存在相关。消除二聚体的现有的尝试需要丢弃它,或使蛋白质变性和重折叠。本发明的方法使用一种新颖的方法克服了上述的障碍,其利用二聚化的CSP而不需要变性和重折叠。在本方法中,在非变性条件下对CSP二聚体进行纯化,然后经历新的优先还原条件。这些优先还原条件还原分子间二硫键以分离单体,同时保持各单体的分子内二硫键。因此,不需要重折叠,且由于使用否则将被丢弃的二聚体而使得产量大大增加。所要求保护的方法的一个显著优点是,从在纯化过程中保持为二聚体的rCSP获得的CSP单体没有在N-末端降解。因此,纯化的rCSP的质量和数量都通过本发明而大大提高。

[0122] 在实施方式中,本发明的纯化方法包括:

[0123] 1) 获得细菌细胞裂解物制剂,其中所述细菌细胞裂解物制剂含有rCSP二聚体;

[0124] 2) 纯化rCSP二聚体;和

[0125] 3) 使经纯化的rCSP二聚体经历优先还原条件,

[0126] 由此获得高品质的rCSP。

[0127] 如所描述的,该优先还原条件将分子间二硫键还原以分离单体,同时保持各单体的分子内二硫键。

[0128] 在实施方式中,所述纯化方法包括进一步纯化分离的rCSP单体。在实施方式中,宿主细胞蛋白通过色谱法,例如,疏水性相互作用色谱法从rCSP单体除去。

[0129] 在实施方式中,所述纯化方法进一步包括通过缓冲液交换除去由优先还原条件引入的还原剂。在这些实施方式中,获得的未降解的rCSP单体不是聚集的。

[0130] 在具体实施方式中,纯化步骤包括:

[0131] a) 将该细胞裂解物制剂分离成可溶性和不溶性部分,其中所述可溶性部分包含rCSP二聚体;和

[0132] b) 将该可溶性部分中的rCSP二聚体与宿主细胞蛋白质分离。

[0133] 在实施方式中,本发明在优先还原步骤后进一步提供用于去除还原剂、解聚剂和/或其他不需要的试剂的方法,而不导致rCSP HMW聚集体的形成。

[0134] 本发明还提供了rCSP稳定液体制剂,包括高浓度rCSP稳定液体制剂。

[0135] 恶性疟原虫环孢子蛋白表达

[0136] 恶性疟原虫孢子蛋白

[0137] 该恶性疟原虫环孢子蛋白(CSP)是由三个主要区域组成的单体:结合硫酸肝素蛋白聚糖的N-末端、四氨基酸重复区域(NANP)和蛋白质的C-末端部分中的血小板反应蛋白样I型重复结构域(图1)。结构研究表明该重复区域形成大约在长度21-25nm和宽度1.5nm的棒状结构(Plassmeyer等,25Sept 2009,J.Biol.Chem.,vol.284no.39:26951-26963,通过引用并入本文)。

[0138] CSP氨基酸和核苷酸序列示于本文的SEQ ID NO:1-6中,和在公开的文献中,例如,在GenBank登录号CAB38998(蛋白质)和XM\_001351086.1(核苷酸);由Ha11,N.等,2002,Nature 419(6906),527-531;和在7,722,889号美国专利中,“疟原虫肝期抗原”,所有在此通过引用并入本文。确定了具有如上所述的和例如由Plassmeyer等人,2009描述的非常相似的序列和相同的结构特征的许多CSP多态性。

[0139] 靶向CSP的疫苗的开发集中于含B细胞表位的中央重复区域及含TSR结构域的C-末端、T细胞表位和B细胞表位(Plassmeyer等,2009,及Rathore和McCutchan,2000,Proc.Nat.Acad.Sci.vol.97no.15:8530-35)。现已显示出N-末端区域在肝细胞附着性和免疫原性中发挥作用,且含有通过硫酸肝素与肝细胞相互作用的表位。针对N-末端区域的表位的抗体被认为在子孢子侵入检测中是抑制性的(参见,例如:Plassmeyer等,2009;Ancsin和Kisilevsky,2004,J.Biol.Chem.279:21824-32;Rathore等,2005,J.Biol.Chem.280:20524-9;和Rathore等,2002,J.Biol.Chem.277:7092-7098.)。Rathore等,2002报道了氨基酸残基28-33参与受体结合,且潜在地形成T细胞表位的残基65-110的识别由Bongfen等,2009(Vaccine 27(2):328-35)报道是对于疾病是保护性的。因此,优先获得用于疫苗研究和生产的具有N-末端区域的CSP。

[0140] CSP具有5个半胱氨酸残基。一个半胱氨酸残基位于N-末端附近,在全长氨基酸序列(其中包含前导序列)的位置25处,如图1和图2A中所示。在图2B和2C中所示的无前导序列的序列中,该半胱氨酸分别在位置25、6和5处,其可称为“C25”或“Cys25”、“C6”或“Cys6”或者“C5”或“Cys5”。Cys25参与在产生CSP二聚体的CSP单体之间的二硫键键合。通常情况下,

在非变性CSP纯化方案中,二聚体包含大部分的rCSP。先前已观察到二聚体在重组细菌裂解物中以高达约40%的测量的CSP存在。

[0141] CSP的N-末端区域易于在几个特定位点被剪切,包括两个主要位点。根据所使用的编号,蛋白质水解的一个主要位点发生在C5和Y6之间,其导致移除残基1-5(参考图2C中SEQ ID NO:3中的编号),发生在C25和Y26之间,其导致移除残基1-25(参考图2A中SEQ ID NO:1中的编号),或发生在C6和Y7之间,其导致移除残基1-6(参考图2B中SEQ ID NO:2中的编号)。第二个要位点是在V14和L15之间,其导致移除残基1-14(参考图2C中SEQ ID NO:3中的编号),在V34和L35之间,其导致移除残基1-34(参照图2A中SEQ ID NO:1中的编号),或在V15和L16之间,其导致移除残基1-15(参考图2B中SEQ ID NO:2中的编号)。在其中观察到高水平的剪切的制剂中,在残基N29/E30和S44/L45之间注意到另外的剪切(参考图2C中SEQ ID NO:3中的编号)。

[0142] 在N-末端的“降解”或“蛋白水解”是指非特异性的降解以及特异性剪切。降解和蛋白水解可产生不希望的rCSP种类。在N-末端区域中未剪切、未降解或未蛋白水解达到特定残基的CSP被本文称为对于存在的最N-末端残基是完整的。例如,被剪切或非特异性降解以除去残基1、2和3和包含残基4的CSP种类被称为降解至残基4和对于残基4是完整的。作为具体例子,被降解至残基谷氨酰胺4(Q4)并且包含残基Q4的种类被称为被降解到残基Q4和从残基Q4是完整的。在本发明的实施方式中,不超过10%的得到的纯化rCSP被降解到指定的残基,例如,选自于残基2-50的残基。在相关实施方式中,至少90%的纯化rCSP对选自残基1-50的残基是完整的。在本发明的实施方式中,在任何给定的纯化步骤后,例如,在HIC后,或在最终的rCSP制剂中,得到的纯化rCSP的不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或没有被降解、剪切或蛋白水解至选自于残基2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的氨基酸。在实施方式中,得到的纯化rCSP的至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%对选自残基1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的氨基酸是完整的。

[0143] 包含血小板反应蛋白样I型重复(TSR)的C-末端区域具有4个半胱氨酸残基(参见,例如,图2A的CSP序列的位置号315、319、350和355,图2A的全序列的位置334、338、369和374,图2B的位置315、319、350和355,和图2C的位置314、318、349和354)。在使用图3C中的编号的C<sub>314</sub>和C<sub>349</sub>以及C<sub>318</sub>和C<sub>354</sub>之间,或者使用图3B中的编号的C<sub>315</sub>和C<sub>350</sub>以及C<sub>319</sub>和C<sub>355</sub>之间形成二硫键。C-末端区域的半胱氨酸残基之间的二硫键的破坏被报道为影响CSP与靶HepG2细胞的结合(Rathore, D., 和McCutchan, T., 2000, Proc. Nat. Acad. Sci. vol. 97no. 15: 8530-35)。需要变性和重折叠通常所获得的二聚化或聚集的rCSP的主要部分的纯化方案遇到在C-末端区域中恢复正确二硫键键合(完整的二硫键)的挑战。

[0144] 在本发明的方法中,优先地将不需要的CSP二聚体还原以生成CSP单体而不使该蛋白质变性。在本发明的实施方式中,得到的未变性的纯化rCSP含有小于约5%的具有不正确二硫键键合的CSP。当在C-末端区域中两个二硫键中的一个或两个不正确配对时,发生不正确的二硫键键合(例如,半胱氨酸与错误的半胱氨酸配对或不配对)。可以使用那些本领域技术人员已知的或本文所述的任何方法来评价不正确的二硫键键合。

[0145] 在实施方式中,在任何给定的纯化步骤之后,例如,HIC之后,,或在最终的rCSP制剂中获得的纯化rCSP含有小于约10%、小于约9%、少于约8%、小于约7%、小于约6%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%的变性rCSP,例如,具有不正确的二硫键键合。在C-末端区域中的两个天然的二硫键中的至少一个错配或不配对时,识别为不正确的二硫键键合。在实施方式中,分别至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的纯化rCSP具有完整的二硫键。

[0146] 图2A示出了如在GenBank CAB38998提供的全长蛋白质,其包含推定的天然分泌信号肽(不存在于该蛋白质的成熟形式中)和GPI锚区域。在实施方式中,使用本发明的方法获得的纯化rCSP不包含GPI锚。根据Ophorst等,删除GPI锚区域提高恶性疟原虫CSP的免疫原性而不改变蛋白质的表达或分泌(Ophorst等,9Feb 2007,Vaccine 25(8):1426-36)。在实施方式中,包含GPI锚区域。在实施方式中,GPI锚区域被截断,也就是说,存在它的部分。图2B和2C中显示了预期用于使用本发明的方法纯化的CSP的氨基酸序列的实例。图2B描绘了除了GenBank CAB38998的氨基酸21至382外具有N-末端甲硫氨酸的细胞质种类。图2C描绘了对应于图2B中的类型的周质种类,也包含GenBank CAB38998的氨基酸21至382。在实施方式中,将分泌前导序列与蛋白质的N-末端融合用于CSP的周质分泌。

[0147] 图2A的CSP是长度397个氨基酸的单体,具有约42.6kDa的分子量和5.37的等电点。图2C的成熟形式(即没有分泌前导序列,氨基酸1-20)是具有约38.7kDa的分子量和5.21的等电点的蛋白质。观察到完全还原时的分子量是38725.0Da,和非还原时(有两个天然分子内二硫键)是38721.0Da。

[0148] CSP变体和修饰

[0149] 如所述的,本发明的方法用于克服以前遇到的rCSP纯化的障碍,包括由于在该蛋白质的N-末端区域中未配对半胱氨酸的存在导致rCSP二聚化和聚集的倾向。

[0150] 在实施方式中,本发明的方法被用于纯化CSP的任何序列变体或修改。在实施方式中,考虑任何CSP变体或多形体的纯化,只要它由于在蛋白质的N-末端区域中含有未配对的硫醇残基(例如,半胱氨酸)的单体之间的相互作用而二聚化。例如,Rathore等,2005(上文所引用的)和Anders等,1989,Polymorphic antigens in Plasmodium falciparum,"Blood 74:1865已经描述了CSP多形性。在已发表的文献中公开的序列包含,例如,GenBank登录号AAA29555、AAN87594、AAA29554.1、AAA29524.1、AAA63421.1、ACO49545.1和AAA63422.1的蛋白质序列。

[0151] 在实施方式中,可以使用本发明的方法纯化的CSP的二聚化变体或修饰包含在N-末端区域中的未配对硫醇残基,和在位置93-113处的N-末端区域表位,如通过Rathore等,2005(在报告中使用的编号)所描述的。在相关的实施方式中,CSP的这些二聚化变体或修饰包含N-末端区域中的未配对硫醇残基,及N-末端区域表位序列ENDDGNNEKLRKPKHKKL (SEQ ID NO:7)或DKRDGNNEKLRKPKHKKL (SEQ ID NO:8)。

[0152] 本发明考虑纯化工程化rCSP修饰以及天然存在的多形性。修饰包括置换、插入、伸长、缺失和衍生化,单独或组合。在实施方式中,rCSP可以包括非必需氨基酸残基的一个或多个修饰。非必需氨基酸残基是可以在新的氨基酸序列中被改变(例如,缺失或置换)而不消除或大大降低蛋白的活性或功能(例如,所述蛋白质的免疫原性或者其与特定抗体结合的能力)的残基。在实施方式中,rCSP可包括必需氨基酸残基的一个或多个修饰。必需氨基

酸残基是当在新的氨基酸序列中被改变(例如,缺失或置换)时,参考肽的活性被显著降低或消除的残基。该置换、插入和缺失可在rCSP的任何区域中。例如,该rCSP可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多的置换,以连续的方式或在整个分子中间隔。单独地或与置换结合,所述rCSP可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多的插入,也以连续的方式或在整个肽分子中间隔。该rCSP(单独地或与置换和/或插入组合)可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个缺失,也以连续的方式或在整个肽分子中间隔。该rCSP(单独地或与所置换、插入和/或缺失组合)可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多的氨基酸添加。

[0153] 置换包括保守的氨基酸置换。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基被具有相似侧链或类似的物理化学特性(例如,静电、氢键、电子等排、疏水特性)的氨基酸残基取代的氨基酸残基置换。所述氨基酸可以是天然的或非天然地发生的。具有相似侧链的氨基酸残基的家族是本领域已知的。这些家族包括具有碱性侧链的(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链的(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。置换还可以包括非保守性的变化。

[0154] 术语“氨基酸”或“氨基酸残基”指天然氨基酸、非天然氨基酸和修饰的氨基酸。除非另有说明,提及的氨基酸包括指D和L立体异构体,如果它们的结构允许这样的立体异构形式。天然氨基酸包括丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和缬氨酸(Val)。非天然氨基酸包括,但不限于高赖氨酸、高精氨酸、高丝氨酸、氮杂环丁烷羧酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 $\beta$ -丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、叔丁基甘氨酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、高脯氨酸、羟赖氨酸、别羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基戊基甘氨酸、N-甲基缬氨酸、萘丙氨酸(naphthalanine)、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、戊基甘氨酸、2-哌啶酸、焦谷氨酸盐和硫代脯氨酸。另外的非天然氨基酸包括在它们的N-末端氨基基团或侧链基团被化学封闭的(可逆或不可逆地)或化学修饰的修饰氨基酸残基,例如,N-甲基化的D和L氨基酸,或者其中侧链官能团被化学修饰成另一种官能团的残基。例如,修饰的氨基酸包括甲硫氨酸亚砷;蛋氨酸砷;天冬氨酸-( $\beta$ -甲基酯)、天冬氨酸的修饰的氨基酸;N-乙基甘氨酸,甘氨酸的修饰氨基酸;或丙氨酸酰胺(alanine carboxamide),丙氨酸的修饰氨基酸。可以并入的另外的残基被描述在Sandberg等.(1998) J. Med. Chem. 41: 2481-2491中。

[0155] 如本领域中所理解的,序列同一性是指如通过序列对比确定的,两个或更多的多肽序列或者两个或更多的多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,同一性也可以指如通过这些序列的串之间的匹配确定的,多肽或多核苷酸序列之间的序列相关性的程度。同一性可以通过已知的方法计算,包括但不限于,Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.



编辑,Oxford University Press,New York(1988);Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编辑,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,Humana Press,New Jersey(1994);Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press(1987);Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,Stockton Press,New York(1991);和Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math,48:1073(1988)中所描述的那些。测定同一性的方法被设计为给予所测试序列之间最大的匹配。此外,用来确定同一性的方法被编码入公开可得的程序中。可用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序包括,但不限于,GCG(Devereux等(1984)Nucleic Acids Research 12:387;5个BLAST程序的套装,3个设计用于核苷酸序列查询(BLASTN,BLASTX和TBLASTX)和两个设计用于蛋白质序列查询(BLASTP和TBLASTN)(Coulson(1994)Trends in Biotechnology 12:76-80;Birren等(1997)Genome Analysis 1:543-559)。该BLAST X程序可公开得自NCBI和其它来源(BLAST手册,Altschul,S等,NCBI NLM NIH,Bethesda,Md.20894;Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-410)。Smith Waterman算法也可以用来确定同一性。

[0156] 在实施方式中,变体rCSP的氨基酸序列与如SEQ ID NO:1(图2A中所示)、SEQ ID NO:2(图2B中所示)或SEQ ID NO:3(图2C所示)中所示的序列有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性。在实施方式中,所述变体rCSP是由与如SEQ ID NO:4(如图3A中所示)或SEQ ID NO:5(如图3B中所示)的序列具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性的核酸序列所编码。

[0157] 恶性疟原虫环孢子蛋白的表达

[0158] 本发明的方法考虑在细菌超表达系统中产生的重组恶性疟原虫环孢子蛋白的纯化。将编码重组蛋白质的基因克隆至表达载体中、用所述表达载体转化细菌宿主细胞以及在适合于表达重组CSP的条件下培育转化的宿主细胞的方法是在具有本领域技术的那些人员的知识范围内。合适的方法在本文中也被描述且在文献中已有描述。

[0159] 用于在假单胞菌属宿主细胞中以及在可用在本发明的方法中的其它宿主细胞中表达异源蛋白质包括有用的调节序列(如启动子、分泌前导序列和核糖体结合位点)的方法被描述在例如名称均为“Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins”的美国专利申请公开号2008/0269070和2010/0137162中,美国专利申请公开号2006/0040352,“Expression of Mammalian Proteins in Pseudomonas Fluorescens”,及美国专利申请公开号2006/0110747,“Process for Improved Protein Expression by Strain Engineering”中,其所有通过引用整体并入本文。这些出版物也描述了可用于实施本发明方法的细菌宿主菌株中,其中所述宿主菌株已被工程化以过表达折叠调节子或其中蛋白酶突变已被引入,以提高异源蛋白质的表达。

[0160] 调控元件

[0161] 可用于实施本发明方法的表达构建体除了蛋白质编码序列之外可包括,可操作地

与之连接的任何以下调节元件：启动子、核糖体结合位点 (RBS)、转录终止子及翻译起始和终止信号、转录增强子序列、翻译增强子序列、其它启动子、活化剂、顺反子调节子、多顺反子调节子、标签序列，如一个和多个核苷酸序列“标签”多肽编码序列，其便于识别、分离、纯化和/或分离表达的多肽。

[0162] 有用的RBS可以从用作表达系统中的宿主细胞的任何物种获得，根据例如，美国专利申请公开号2008/0269070和美国专利申请公开号2010/0137162。许多特定的和多种一致的RBS是已知的，例如，那些在D.Frushman等, Gene 234 (2) : 257-65 (8 Jul. 1999) ; 和B.E.Suzek等, Bioinformatics 17 (12) : 1123-30 (December 2001) 中所描述和引用的。此外，也可以使用天然的或合成的RBS，例如，在：EP 0207459 (合成的RBS) ; O.Ikehata等, Eur. J. Biochem. 181 (3) : 563-70 (1989) 中描述的那些 (天然RBS序列AAGGAAG)。可用于本发明中的方法、载体以及翻译和转录元件和其它元件的进一步实例被描述于，例如：Gilroy的5,055,294号美国专利和Gilroy等的5,128,130号美国专利；Rammner等的5,281,532号美国专利；Barnes等的4,695,455和4,861,595号美国专利；Gray等的4,755,465号美国专利；和Wilcox的5,169,760号美国专利，其通过引用整体并入本文。

[0163] 前导序列

[0164] 在实施方式中，将编码分泌前导肽的序列融合编码CSP的序列。在实施方式中，所述分泌前导序列是周质分泌前导序列。在实施方式中，所述分泌前导序列是天然分泌前导序列。

[0165] 在实施方式中，在生产过程中可溶性蛋白存在于细胞的细胞质或周质中。用于在优化的异源蛋白质表达中选择和使用分泌信号肽或前导序列的方法被详细的描述于，例如，7,618,799号美国专利，“Bacterial leader sequences for increased expression”和7,985,564号美国专利，“Expression systems with Sec-secretion”中，其中两者通过引用全部并入本文，以及在以上引用的美国专利申请公开号008/0269070和2010/0137162中。下面的表1提供了预期与本发明的方法联合使用的分泌前导序列的非限制性实例。

[0166] 在实施方式中，使用的分泌前导序列是LA0、pbp、pbpA20V或cupA2。在具体实施方式中，使用LA0分泌前导序列。

[0167] 表1. 示例性分泌前导序列

[0168]

分泌前导 序列	氨基酸序列	SEQ ID NO:
DsbA	MRNLILSAALVTASLFGMTAQA	9
Azu	MFAKLVAVSLLTLASGQLLA	10
Ibp-S31A	MIRDNRLKTSLLRGLTLTLLSLTLLSPAHA	11
Tpr	MNRSSALLLAFVFLSGCQAMA	12
CupB2	MLFRTLASLTFAVIAGLPSTAHA	13
CupA2	MSCTRAFKPLLLIGLATLMCSHAFA	14
NikA	MRLAALPLLLAPLFIAPMAVA	15
Pbp A20V	MKLRRLMAAMTFVAAGVATVNAVA	16
DsbC	MRLTQIIAAAAIALVSTFALA	17
ToIB	MRNLLRGMLVVICCMAGIAAA	18
Pbp	MKLRRLMAAMTFVAAGVATANAVA	19
Lao	MQNYKKFLLAAAVSMAFSATAMA	20
CupC2	MPPRSIAACLGLLGLLMATQAAA	21
PorE	MKKSTLAVAVTLGAIAQQAGA	22
Pbp	MKLRRLMAAMTFVAAGVATANAVA	23
FlgI	MKFKQLMAMALLLALSAVAQA	24
ttg2C	MQNRTVEIGVGLFLLAGILALLLALRVSGLSA	25

[0169] 启动子

[0170] 按照本发明用于表达纯化的rCSP中所用的启动子可以是组成型启动子或调控型启动子。选择用于调控异源蛋白质的表达的可用启动子的方法是本领域众所周知的，并且在文献中广泛地描述。有用的调控型启动子的常见例子包括那些源自lac启动子家族的那些(即lacZ启动子)，包括在DeBoer的4,551,433号美国专利中所描述的tac和trc启动子，以及Ptac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5和T7lac启动子。在一个实施方式中，所述启动子并非源自于所述宿主细胞有机体。在实施方式中，启动子是源自于大肠杆菌有机体。

[0171] 诱导型启动子序列可用于调控根据本发明方法的CSP的表达。在实施方式中，在本发明的方法中有用的诱导型启动子包括源自于lac启动子的家族的那些(即lacZ启动子)，特别是tac和trc启动子，其被描述于DeBoer的4,551,433号美国专利中，以及Ptac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5和T7lac启动子。在一个实施方式中，启动子并非源自于宿主细胞有机体。在某些实施方式中，启动子是源自于大肠杆菌有机体。

[0172] 在根据本发明的表达系统中可用的非lac型启动子的常见实例包括，例如，列于表2中的那些。

[0173] 表2.非-lac启动子的实例

[0174]

启动子	诱导物
P <sub>R</sub>	高温
P <sub>L</sub>	高温
P <sub>m</sub>	烷基或卤代苯甲酸盐类
P <sub>u</sub>	烷基或卤代甲苯类
P <sub>sal</sub>	水杨酸盐类

[0175] 参见,例如:J.Sanchez-Romero & V.De Lorenzo(1999)Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology(A.Demain & J.Davies,eds.)pp.460-74(ASM Press, Washington,D.C.);H.Schweizer(2001)Current Opinion in Biotechnology,12:439-445;和R.Slater & R.Williams(2000Molecular Biology and Biotechnology(J.Walker & R.Rapley,eds.)pp.125-54(The Royal Society of Chemistry,Cambridge,UK)).也可以使用具有对于所选择的细菌宿主细胞天然的启动子的核苷酸序列的启动子来控制编码靶多肽的转基因的表达,例如,假单胞菌邻氨基苯甲酸或苯甲酸操纵子启动子(Pant、Pben)。也可使用其中多于一种启动子共价连接到另一个的串联启动子,无论序列相同或不同,例如,Pant-Pben串联启动子(启动子内杂交)或Plac-Plac串联启动子,或无论是否源自于相同或不同的生物体。

[0176] 调控型启动子利用启动子调控蛋白以控制所述启动子是其部分的该基因的转录。在本文中使用的调控型启动子时,相应的启动子调控蛋白也是根据本发明的表达系统的一部分。启动子调控蛋白的实例包括:激活蛋白,例如,大肠杆菌分解代谢物激活蛋白,MaIT蛋白;AraC家族转录激活剂;阻遏剂蛋白,例如,大肠杆菌了LacI蛋白质;和双功能调控蛋白,例如,大肠杆菌NagC蛋白。许多调控型-启动子/启动子-调控蛋白对是本领域已知的。在一个实施方式中,靶蛋白和感兴趣的异源蛋白质的表达构建体是受相同的调控元件控制的。

[0177] 启动子调控蛋白与效应子化合物相互作用,即可逆或不可逆地与调控蛋白结合以使该蛋白质能够释放或结合于在该启动子的控制下的基因的至少一个DNA转录调控区域的化合物,从而允许或阻断转录酶在启动基因转录中的作用。效应子化合物被分类为诱导物或辅阻遏物,且这些化合物包含天然效应子化合物和安慰诱导剂化合物。许多调控型启动子/启动子-调控蛋白/效应子化合物三元组是本领域已知的。虽然在整个细胞培养或发酵中可使用效应子化合物,但在其中使用调控型启动子的优选实施方式中,在生长所期望的量或密度的宿主细胞生物质后,向培养物中添加适宜的效应子化合物以直接或间接地导致编码所需目标蛋白质或多肽的基因的表达。

[0178] 在其中利用lac家族启动子的实施方式中,lacI基因也可存在于系统中。通常是组成型表达的基因的lacI基因编码lac阻遏物蛋白LacI蛋白,其结合于lac家族启动子的lac操纵子。因此,在其中利用lac家族启动子的情况中,在表达系统中也可包含和表达lacI基因。

[0179] 可用在假单胞菌属中的启动子系统被描述在文献中,例如,美国专利申请公开号2008/0269070中,也在上面引用。

[0180] 宿主细胞

[0181] 本发明的方法可用于纯化在任何细菌宿主细胞表达系统中表达的rCSP,包括但不限于假单胞菌和大肠杆菌宿主细胞。在实施方式中,rCSP在假单胞菌或密切相关的细菌生物体中表达。在某些实施方式中,假单胞菌宿主细胞是荧光假单胞菌。在实施方式中,宿主细胞是大肠杆菌、枯草杆菌或恶臭假单胞菌。

[0182] 可使用本领域已知的和文献中描述的试剂和方法识别或制备可用于实施本发明方法的细菌宿主细胞和构建体,例如美国专利申请公开号2009/0325230,“Protein Expression Systems”,其整体通过引用并入本文。这一公开描述了通过将核酸构建体引入包含染色体的lacI基因插入片段的营养缺陷型荧光假单胞菌宿主细胞而产生重组多肽。所述核酸构建体包含编码可操作地连接于能够指导核酸在宿主细胞中表达的启动子的所述重组多肽的核苷酸序列,并且还包含编码营养缺陷型选择标记的核苷酸序列。营养缺陷型选择标记是将原养型恢复至营养缺陷型宿主细胞的多肽。在实施方式中,所述细胞是对于脯氨酸、尿嘧啶或它们的组合营养缺陷型的。在实施方式中,所述宿主细胞源自MB101(ATCC保藏PTA-7841),其使用本领域的技术人员已知的和被描述于科学文献中的方法。例如,美国专利申请公开号2009/0325230,和Schneider等,2005,“Auxotrophic markers pyrF and proC can replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density Pseudomonas fluorescens fermentation”*Biotechnol. Progress* 21(2): 343-8(其全部通过引用整体并入本文中)描述了尿嘧啶营养缺陷型的生产宿主菌株,它是通过在菌株MB101中删除pyrF基因产生的。从菌株MB214(ATCC保藏PTA-7840)克隆该pyrF基因以产生可以补充pyrF缺失以恢复原养型的质粒。

[0183] 在具体实施方式中,使用在荧光假单胞菌宿主细胞中的双重PyrF-ProC双营养缺陷型选择标记系统。如所述的pyrF生产宿主菌株可作用于引入其它所需的基因组变化的背景,包括在本文描述为可用来实施本发明的方法的那些。在实施方式中,荧光假单胞菌宿主菌株是具有基因型 $\Delta$  pyrF、lacI<sup>Q</sup>和 $\Delta$  htpX的pyrF生产宿主菌株。在实施方式中,lacI<sup>Q</sup>被插入lvs基因中(lvs:lacIQ1)。

[0184] 在实施方式中,来源于生物变型1菌株MB101的荧光假单胞菌宿主菌株DC469( $\Delta$  pyrF、lacI<sup>Q</sup>、 $\Delta$  htpX)被用于生产在本发明的方法中可用的rCSP。在菌株DC469中,lacI<sup>Q</sup>被插入lvs基因中(lvs:lacIQ1)。LacI<sup>Q</sup>插入通常是在各个不同适当位置的任一个进行的,如本领域的那些技术人员所知的。

[0185] 在实施方式中,所述宿主细胞为假单胞菌目。当宿主细胞为假单胞菌目,它可以是假单胞菌科的成员,包括假单胞菌属。 $\gamma$ 变形杆菌宿主包括大肠杆菌种的成员和荧光假单胞菌种的成员。

[0186] 其他假单胞菌属的有机体也可以是可用的。假单胞菌和密切相关的物种包括革兰氏阴性变形细菌亚组1,其包括属于由R.E.Buchanan和N.E.Gibbons编辑的“Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci”,*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*,pp.217-289(8th ed.,1974)(The Williams&Wilkins Co.,Baltimore,Md.,USA)所述的科和/或属的变形杆菌组。表3列出了生物体的这些科和属。

[0187] 表3.“革兰氏阴性需氧杆菌和球菌”(Bergey,1974年)部分中列出的科和属

[0188]

科 I. 假单胞菌科	葡糖杆菌属 假单胞菌属 黄杆菌属 动胶菌属
科 II. 固氮菌科	氮单胞菌属 固氮菌属 拜叶林克氏菌属 德克斯氏菌属
科 III. 根瘤菌科	土壤杆菌属 根瘤菌属
科 IV. 甲基单胞菌科	甲基球菌属 甲基单胞菌属
科 V. 盐细菌科	盐杆菌属 盐球菌属
其他属	醋酸杆菌属 产碱杆菌属 博德特氏菌属 布氏杆菌属 弗朗西斯氏菌属 栖热菌属

[0189] 假单胞菌属和密切相关的细菌一般是被定义为“革兰氏(-)变形杆菌亚组1”或“革兰氏阴性需氧杆菌和球菌”(Buchanan和Gibbons(eds.)(1974)Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp.217-289)的部分。假单胞菌属宿主菌株被描述于文献中,例如,在美国专利申请公开号2006/0040352中,上面引用。

[0190] “革兰氏阴性变形杆菌亚组1”还包括根据在分类学中使用的标准被分类在该标题下的变形杆菌。该标题还包括以前被归类于本部分但不再属于的组群,如食酸菌属、短波单胞菌属、伯克氏菌属、氢噬胞菌属、海单胞菌属(oceanimonas)、青枯菌属和寡养单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属(和芽单胞菌属,由其衍生的),其通过重新分组属于黄单胞菌属(以前所称的种)的生物体产生、酸单胞菌属,其通过重新分组属于如Bergey(1974)所定义的醋杆菌属的生物体产生。另外宿主可以包括来自假单胞菌属、Pseudomonas enalia(ATCC14393)、黑色假单胞菌(Pseudomonas nigrifaciensi)(ATCC19375)和腐败假单胞菌(Pseudomonas

putrefaciens) (ATCC 8071) 的细胞,其已被分别重新分类为河豚毒素交替单胞菌 (*Alteromonas haloplanktis*)、产黑交替单胞菌 (*Alteromonas nigrifaciens*) 和腐败交替单胞菌 (*Alteromonas putrefaciens*)。类似地,例如,食酸假单胞菌 (*Pseudomonas acidovorans*) (ATCC 15668) 和睾丸酮假单胞菌 (*Pseudomonas testosteroni*) (ATCC11996) 之后被分别重新分类为食酸丛毛单胞菌 (*Comamonas acidovorans*) 和睾丸酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni*);以及黑色假单胞菌 (ATCC 19375) 和杀鱼假单胞菌 (*Pseudomonas piscicida*) (ATCC 15057) 被分别重新分类为 *Pseudoalteromonas nigrifaciens* 和杀鱼假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas piscicida*)。“革兰氏阴性变形杆菌亚组 I”还包括被分类为属于任何以下科的变形杆菌:假单胞菌科、固氮菌科 (现常被称为同义词—假单胞菌科的“固氮菌组”)、根瘤菌科和甲基单胞菌科 (现常被称为同义词“甲基球菌科”)。因此,除了本文另外描述的那些属以外,属于“革兰氏阴性变形杆菌亚组 I”的进一步变形杆菌属包括:1) 嗜氮根瘤菌属的固氮菌组细菌;2) 纤维弧菌属 (*Cellvibrio*)、寡源杆菌属 (*Oligella*) 和 *Teredinibacter* 的假单胞菌科细菌;3) 螯合杆菌属 (*Chelatobacter*)、剑菌属 (*Ensifer*)、韧皮部杆菌属 (*Liberibacter*) (也称为“柑橘黄龙病菌 (*Candidatus Liberibacter*)”) 和中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 的根瘤菌科细菌;以及4) 甲基杆菌属 (*Methylobacter*)、喜热嗜甲基菌属 (*Methylocaldum*)、甲基微菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基八迭球菌属 (*Methylosarcina*) 和甲基球菌属 (*Methylosphaera*) 的甲基球菌科细菌。

[0191] 宿主细胞可以选自“革兰氏阴性变形杆菌亚组 16”。“革兰氏阴性变形杆菌亚组 16”被定义为以下的假单胞菌物种 (具有在括号中显示示例性菌株的 ATCC 或其它保藏号) 的变形杆菌组: *Pseudomonas abietaniphila* (ATCC700689)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC 10145)、产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*) (ATCC 14909)、鳃败血假单胞菌 (*Pseudomonas anguilliseptica*) (ATCC 33660)、香茅醇假单胞菌 (*Pseudomonas citronellolis*) (ATCC 13674)、黄假单胞菌 (*Pseudomonas flavescens*) (ATCC51555)、门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) (ATCC 25411)、硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens*) (ATCC33634)、食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) (ATCC 8062)、类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) (ATCC 17440)、食树脂假单胞菌 (*Pseudomonas resinovorans*) (ATCC 14235)、稻草假单胞菌 (*Pseudomonas straminea*) (ATCC 33636)、伞菊假单胞菌 (*Pseudomonas agarici*) (ATCC25941)、嗜碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaliphila*)、*Pseudomonas alginovora*、*Pseudomonas andersonii*、铁角蕨假单胞菌 (*Pseudomonas asplenii*) (ATCC 23835)、壬二酸假单胞菌 (*Pseudomonas azelaica*) (ATCC27162)、*Pseudomonas beyerinckii* (ATCC 19372)、*Pseudomonas borealis*、北城假单胞菌 (*Pseudomonas boreopolis*) (ATCC 33662)、油菜假单胞菌 (*Pseudomonas brassicacearum*)、食丁酸假单胞菌 (*Pseudomonas butanovora*) (ATCC 43655)、*Pseudomonas cellulosa* (ATCC 55703)、桔黄假单胞菌 (*Pseudomonas aurantiaca*) (ATCC33663)、绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) (ATCC 9446、ATCC13985、ATCC 17418、ATCC 17461)、莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) (ATCC 4973)、海雀假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*) (ATCC49968)、腐臭假单胞菌 (*Pseudomonas taetrolens*) (ATCC 4683)、青紫葛假单胞菌 (*Pseudomonas cissicola*) (ATCC 33616)、晕斑假单胞菌

(*Pseudomonas coronafaciens*)、*Pseudomonas diterpeniphila*、伸长假单胞菌 (*Pseudomonas elongata*) (ATCC10144)、弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas flectens*) (ATCC 12775)、生氮假单胞菌 (*Pseudomonas azotoformans*)、布氏假单胞菌 (*Pseudomonas brenneri*)、*Pseudomonas cedrella*、起皱假单胞菌 (*Pseudomonas corrugata*) (ATCC29736)、*Pseudomonas extremorientalis*、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (ATCC35858)、*Pseudomonas gessardii*、*Pseudomonas libanensis*、孟氏假单胞菌 (*Pseudomonas mandelii*) (ATCC 700871)、边缘假单胞菌 (*Pseudomonas marginalis*) (ATCC 10844)、*Pseudomonas migulae*、霉味假单胞菌 (*Pseudomonas mucidolens*) (ATCC 4685)、*Pseudomonas orientalis*、罗氏假单胞菌 (*Pseudomonas rhodesiae*)、产黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxantha*) (ATCC 9890)、托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*) (ATCC33618)、威隆假单胞菌 (*Pseudomonas veronii*) (ATCC700474)、弗雷德里克斯堡假单胞菌 (*Pseudomonas frederiksbergensis*)、弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas geniculata*) (ATCC 19374)、*Pseudomonas gingeri*、*Pseudomonas graminis*、格氏假单胞菌 (*Pseudomonas grimontii*)、*Pseudomonas halodenitrificans*、嗜盐假单胞菌 (*Pseudomonas halophila*)、栖木槿假单胞菌 (*Pseudomonas hibiscicola*) (ATCC 19867)、赫替假单胞菌 (*Pseudomonas huttiensis*) (ATCC 14670)、噬氢假单胞菌 (*Pseudomonas hydrogenovora*)、江逊假单胞菌 (*Pseudomonas jessenii*) (ATCC 700870)、基尔假单胞菌 (*Pseudomonas kilonensis*)、柳叶刀假单胞菌 (*Pseudomonas lanceolata*) (ATCC 14669)、亚麻假单胞菌 (*Pseudomonas lini*)、划界假单胞菌 (*Pseudomonas marginata*) (ATCC 25417)、臭味假单胞菌 (*Pseudomonas mephitica*) (ATCC33665)、脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) (ATCC 19244)、穿孔假单胞菌 (*Pseudomonas pertucinogena*) (ATCC 190)、皮克特假单胞菌 (*Pseudomonas pictorum*) (ATCC 23328)、*Pseudomonas psychrophila*、黄褐假单胞菌 (*Pseudomonas filva*) (ATCC 31418)、蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*) (ATCC 700476)、*Pseudomonas mosselii*、栖稻假单胞菌 (*Pseudomonas oryzihabitans*) (ATCC 43272)、变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) (ATCC 700383)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) (ATCC 12633)、*Pseudomonas reactans*、多刺假单胞菌 (*Pseudomonas spinosa*) (ATCC 14606)、巴利阿里假单胞菌 (*Pseudomonas balearica*)、浅黄假单胞菌 (*Pseudomonas luteola*) (ATCC43273)、施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) (ATCC 17588)、扁桃假单胞菌 (*Pseudomonas amygdali*) (ATCC 33614)、*Pseudomonas avellanae* (ATCC700331)、番木瓜假单胞菌 (*Pseudomonas caricapapayae*) (ATCC33615)、菊苣假单胞菌 (*Pseudomonas cichorii*) (ATCC 10857)、天仙果假单胞菌 (*Pseudomonas ficuserectae*) (ATCC 35104)、褐鞘假单胞菌 (*Pseudomonas fuscovaginae*)、苦楝假单胞菌 (*Pseudomonas meliae*) (ATCC33050)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) (ATCC 19310)、绿黄假单胞菌 (*Pseudomonas viridiflava*) (ATCC13223)、热食碳酸假单胞菌 (*Pseudomonas thermocarboxydovorans*) (ATCC 35961)、耐热假单胞菌 (*Pseudomonas thermotolerans*)、赛维瓦尔假单胞菌 (*Pseudomonas thivervalensis*)、温哥华假单胞菌 (*Pseudomonas vancouverensis*) (ATCC700688)、威斯康里假单胞菌 (*Pseudomonas wisconsinensis*) 和厦门假单胞菌 (*Pseudomonas xiamenensis*)。在一个实施方式中,所述宿主细胞是荧光假单胞菌。



[0192] 所述的宿主细胞也可以选自“革兰氏阴性变形杆菌亚组17”。“革兰氏阴性变形杆菌亚组17”被定义为本领域中已知为“发荧光的假单胞菌”的变形杆菌组,其包括,例如属于下列假单胞菌种的那些:生氮假单胞菌、布氏假单胞菌、*Pseudomonas cedrella*、起皱假单胞菌、*Pseudomonas extremorientalis*、荧光假单胞菌、*Pseudomonas gessardii*、*Pseudomonas libanensis*、孟氏假单胞菌、边缘假单胞菌、*Pseudomonas migulae*、霉味假单胞菌、*Pseudomonas orientalis*、罗氏假单胞菌、产黄假单胞菌、托拉斯假单胞菌和威隆假单胞菌。

[0193] 在其它实施方式中,假单胞菌宿主细胞过表达DsbA、DsbB、DsbC和DsbD。DsbA、B、C和D是二硫键异构酶,被描述于,例如,在美国专利申请公开号2008/0269070和2010/0137162中。

[0194] 在其它实施方式中,假单胞菌宿主细胞是野生型的,即,不具有蛋白酶表达缺陷和不过表达任何折叠调节子。

[0195] 蛋白酶表达缺陷的宿主细胞可以具有导致该蛋白酶的正常活性或表达水平相对于野生型宿主下降的任何修饰。例如,错义或无义突变可导致非活性的蛋白质的表达,且基因缺失可以导致完全没有蛋白质的表达。该基因的上游调控区域的变化可以导致蛋白表达减少或不表达。其他的基因缺陷可影响蛋白质的翻译。蛋白酶的表达也可以是缺陷的,如果对于加工该蛋白酶所需的蛋白质的活性是缺陷的。

[0196] 用于产生与本发明的方法相关的可的假单胞菌宿主细胞的蛋白酶和折叠调节子的实例,和用于识别宿主细胞的方法,被描述于,例如,美国专利申请公开号2008/0269070和2010/0137162中,以上引用。

[0197] 密码子优化

[0198] 用于优化密码子以改善外源蛋白在细菌宿主中的表达的方法是本领域中已知的并描述于文献中。例如,用于在假单胞菌属宿主菌株中表达的密码子优化被描述在例如,美国专利申请公开号2007/0292918,“Codon Optimization Method”中,其全部内容通过引用并入本文。用于在大肠杆菌中表达密码子优化被例如,Welch等,2009,PLoS One,“DesignParameters to Control Synthetic Gene Expression in Escherichia coli,4(9):e7002描述,其全部通过引用并入本文。

[0199] 表4.在荧光假单胞菌MB214中以低于5%存在的密码子

[0200]

氨基酸	使用的密码子	%存在率
G Gly	GGA	3.26
I Ile	ATA	3.05
L Leu	CTA	1.78
	CTT	4.57
	TTA	1.89
R Arg	AGA	1.39
	AGG	2.72
	CGA	4.99
S Ser	TCT	4.28

[0201] 本发明考虑使用用于CSP的任何编码序列,包括已经被优化用于在所使用的宿主细胞中表达的任何序列。预期使用的序列可以被优化至任何所需的程度,包括但不限于,优化以消除:在假单胞菌属宿主细胞中以小于5%存在的密码子、在假单胞菌属宿主细胞中以小于10%存在的密码子、稀有密码子诱导的翻译中止、推定的内部RBS序列、G或C核苷酸的延伸重复、干扰二级结构、限制位点或它们的组合。

[0202] 此外,可用于实施本发明的方法的任何分泌前导肽的氨基酸序列可以通过任何合适的核酸序列编码。

[0203] 发酵形式

[0204] 用于根据本发明的方法纯化的重组蛋白的表达可以以任何发酵形式完成。例如,分批、分批补料、半连续和连续发酵模式可以在本发明中使用。本领域技术人员可以使用文献中描述的方法,将导致在细菌表达系统中产生重组蛋白(例如,CSP)的发酵条件优化为认为是合适的。例如,用于优化毒素蛋白产生的方法被描述在美国专利申请公开号2011/0287443,“High Level Expression of Recombinant Toxin Proteins”中,通过引用将其全部并入本文。在实施方式中,发酵培养基可以选自丰富培养基、基本培养基和矿物盐培养基。在其它实施方式中,选择基本培养基或矿物盐培养基。在某些实施方式中,选择矿物盐培养基。

[0205] 矿物盐培养基由矿物盐和碳源如,葡萄糖、蔗糖或甘油组成。矿物盐培养基的实例包括,例如,M9培养基、假单胞菌培养基(ATCC179)及Davis和Mingioli培养基(见B D Davis&E S Mingioli (1950) J.Bact.60:17-28)。用于制备矿物盐培养基的矿物盐包括选自例如,磷酸钾、硫酸铵或氯化铵、硫酸镁或氯化镁和微量矿物质如氯化钙、硼酸盐及铁、铜、锰和锌的硫酸盐的那些。通常情况下,矿物盐培养基中不包括有机氮源,如蛋白胨、胰蛋白胨、氨基酸或酵母提取物。相反,使用无机氮源且它可以选自例如,铵盐、氨水以及气态氨。矿物盐培养基通常包含葡萄糖或甘油作为碳源。与矿物盐培养基相比,基本培养基也可以包含矿物盐和碳源,但可补充例如,低水平的氨基酸、维生素、蛋白胨或其它成分,尽管这些成分以非常低的水平添加。可以使用本领域,例如,美国专利申请公开号2006/0040352中描

述的方法制备培养基,以上通过引用并入本文。本发明的方法中可使用的培养程序和矿物盐培养基的细节由Riesenberg,D等,1991,“High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate,”*J.Biotechnol.*20(1):17-27描述。

#### [0206] 发酵规模

[0207] 本发明的纯化方法特别有用,因为它们可以放大以处理大量的蛋白质。rCSP的扩大生产通常会导致rCSP聚集。本方法与大规模处理相容,并且预期当原料含有大量rCSP时使用。本发明的纯化方法也考虑用于从任何较小规模生产的细菌细胞裂解物获得蛋白质。因此,例如,微升规模、厘升规模和分升规模的发酵体积都可以使用。在实施方式中,使用1升的规模以及较大的发酵体积。

[0208] 在实施方式中,发酵体积为约1升至约100升。在某些实施方式中,发酵体积为至少约2升、至少约3升、至少约4升、至少约5升、至少约6升、至少约7升、至少约8升、至少约9升、至少约10升、至少约20升、至少约25升、至少约50升、至少约75升、至少约100升、至少约200升、至少约500升、至少约1000升、至少约2000升、至少约5000升、至少约10,000升或至少约50,000升。在实施方式中,所述发酵体积为约1升至约5升、约1升至约10升、约1升至约20升、约1升至约25升、约1升至约50升、约1升至约75升、约10升至约25升、约25升至约50升或约50升至约100升。

#### [0209] 高通量筛选

[0210] 在一些实施方式中,可以进行高通量筛选以确定用于表达rCSP的最佳条件。在筛选中可变的条件包括,例如,宿主细胞、宿主细胞的遗传背景(例如,不同蛋白酶基因的缺失或折叠调节子的过表达)、表达构建体中的启动子类型、与编码重组蛋白的序列融合的分分泌前导序列的类型、生长温度、当使用诱导型启动子时进行诱导的OD、使用的诱导剂(例如,当使用lacZ启动子时的IPTG)的浓度、蛋白质诱导的持续时间、向培养物中加入诱导剂后的生长温度、培养物的搅拌速度、质粒保持的选择方法、容器中的培养物体积,等。

[0211] 筛选微生物宿主以鉴定异源蛋白质表达的产率和/或量提高的菌株的方法在例如,美国专利申请公开号2008/0269070中描述。

#### [0212] 诱导

[0213] 如本文中其它地方所描述的,诱导型启动子可用于表达构建体中以控制重组蛋白的表达,例如,lac启动子。在lac启动子衍生物或家族成员(如tac启动子)的情况下,效应化合物是诱导剂,如安慰诱导剂,例如,IPTG(异丙基- $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷,也称为“异丙基硫代半乳糖苷”)、乳糖或异乳糖。在实施方式中,使用lac启动子衍生物,且当细胞密度达到通过约80至约160的OD<sub>575</sub>确定的水平时,重组蛋白质表达通过添加IPTG至约0.01mM至约1.0mM的终浓度进行诱导。在其中使用非-lac型启动子的实施方式中,如在本文中或在文献中描述的,可以使用其它诱导剂或效应物。在一个实施方式中,所述启动子是组成型启动子。用于诱导启动子的方法被描述在本领域中,例如,7,759,109号美国专利,“High Density Growth of T7 Expression Strains with Auto-induction Option”中和美国专利申请公开号2011/0217784,“Method for Producing Soluble Recombinant Interferon Protein without Denaturing”中,其全部通过引用整体并入本文。

[0214] 在具体的实施方式中,在荧光假单胞菌中表达rCSP且表达通过lac启动子调控。在

这些实施方式中,发酵培养物在100-160AU(吸光度单位)在575nm的诱导细胞密度下,用0.1至0.2mM的IPTG,在pH 6.5至7.2,在27至32°C的温度下诱导。

#### [0215] 蛋白质纯化

[0216] 在本发明的方法中,重组恶性疟原虫CSP的二聚体是从由表达rCSP的细胞制备的细菌细胞裂解物纯化的。在实施方式中,纯化包括将CSP二聚体与宿主细胞碎片和蛋白质及其他杂质分离以生成包含CSP二聚体的可溶性部分和不溶性部分。在可溶性部分中的CSP二聚体与宿主细胞蛋白质和任何其它不需要的杂质分离。可以根据所使用的分离方法在不同的工艺步骤或在相同的工艺步骤中实施与宿主细胞碎片的分离、与宿主细胞蛋白质分离、与不需要的rCSP种类(包括例如N-末端剪切种类、高分子量聚集体、二聚体和变性的种类)分离和与任何其它杂质分离。可用于根据本发明的方法纯化rCSP的分离方法被描述于文献中,例如,在Methods in Enzymology(1990)卷182.A Guide to Protein Purification.由M.P.Deutscher编辑.Academic Press;和Ausubel,F.M.,Brett,R.,Kingston,R.E.,Moore,D.D.,Seidman,J.G.,Smith,J.A.和Struhl,L.1991.Current Protocols in Molecular Biology,卷1.Wiley.New York中,其全部通过引用整体并入本文。

#### [0217] 可放大的工艺

[0218] rCSP的扩大生产通常导致蛋白质聚集。本发明的纯化方法是可放大的,并且可以被用来从包含大量rCSP的原料(例如细胞培养物或细菌细胞裂解物)以高的总体纯化工率纯化rCSP。在实施方式中,所述方法可放大到包含约100mg至约3000g的rCSP的起始量或初始负荷的rCSP。在实施方式中,rCSP的起始量包含约1克至约3000克、约100克至约3000克、约250克至约3000克、约500克至约3000克、约750克至约3000克、约1000克至约3000克、约100克至约2000克、约250克至约2000克、约500克至约2000克、约750克至约2000克、约1000克至约2000克、约100克至约1000克、约150克至约1000克、约200克至约1000克、约250克至约1000克、约300克至约1000克、约400克至约1000克、约500克至约1000克或约750克至约1000克。在实施方式中,本发明的方法被用于获得任何上述起始量的rCSP,其总体纯化过程产率为至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约30%至约75%、约30%至约70%、约30%至约65%或约30%至约60%。在实施方式中,上述纯化过程产率包含不超过10%的变性rCSP、不超过10%的降解rCSP和/或10%的二聚化rCSP。在实施方式中,上述纯化过程产率包含不超过5%的变性rCSP、不超过5%的降解rCSP和/或不超过5%的二聚化rCSP。

#### [0219] 优先还原条件

[0220] 在本发明的方法中,在本发明的方法中与宿主细胞蛋白质分离的rCSP二聚体经历优先还原条件。这些优先还原条件选择性地还原某些二硫键而留下其他的二硫键保持完整。当rCSP经历优先还原条件时,rCSP二聚体的分子间二硫键被还原以将二聚体分离成两个单体。例如,如通过在C-末端区域中的两个分子内二硫键表示的结构保持完整。因此,优先还原条件对于高的总体过程产率是关键(由于二聚体的利用),并且相对于以前使用的方法降低了复杂性(由于缺少折叠步骤以及不需要将单体与二聚体分离)。该策略的进一步

优点是获得的在纯化过程中较大比例的保持为二聚体的rCSP具有完整的N-末端。因此,回收的rCSP的质量和数量被大大改善。在实施方式中,优先还原条件包含轻度还原剂。在实施方式中,所述轻度还原剂是DTT、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油(MTG)、巯基乙酸盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇(B-巯基乙醇)、TCEP-HCl(纯结晶三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐)或2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)或本领域中已知的任何其它合适的还原剂。在某些实施方式中,所述轻度还原剂是约0.001至约0.1mM的终浓度的二硫苏糖醇(DTT)。在实施方式中,轻度还原剂包含约0.010mM至约0.030mM、约0.010mM至约0.020mM、0.010mM至约0.025mM、0.020mM至约0.025mM、0.020mM至约0.030mM或约0.025mM至约0.030mM的终浓度的DTT。在实施方式中,DTT的浓度为约20 $\mu$ M。在实施方式中,所述轻度还原剂是终浓度约0.5mM至约5mM的单硫代甘油(MTG)。在实施方式中,轻度还原剂包含终浓度约0.5mM至约4mM、约0.5mM至约3mM、约0.5mM至约2mM、约0.5mM至约1mM、约0.6mM至约2mM、约0.6mM至约1.5mM、约0.6mM至约1.4mM、约0.6mM至约1.3mM、约0.6mM至约1.2mM、约0.6mM至约1.1mM、约0.6mM至约1.05mM、约0.6mM至约1mM、约0.7mM至约2mM、约0.7mM至约1.5mM、约0.7mM至约1.4mM、约0.7mM至约1.3mM、约0.7mM至约1.2mM、约0.7mM至约1.1mM、约0.7mM至约1.05mM、约0.7mM至约1mM、约0.8mM至约2mM、约0.8mM至约1.5mM、约0.8mM至约1.4mM、约0.8mM至约1.3mM、约0.8mM至约1.2mM、约0.8mM至约1.1mM、约0.8mM至约1.05mM、约0.8mM至约1mM、约0.9mM至约2mM、约0.9mM至约1.5mM、约0.9mM至约1.4mM、约0.9mM至约1.3mM、约0.9mM至约1.2mM、约0.9mM至约1.1mM、约0.9mM至约1.05mM、约0.9mM至约1mM、约1mM至约1.5mM、约1mM至约1.4mM、约1mM至约1.3mM、约1mM至约1.2mM、约1mM至约1.1mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、约1.0mM、约1.1mM、约1.2mM、约1.3mM、约1.4mM、约1.5mM、约1.6mM、约1.7mM、约1.8mM、约1.9mM、约2.0mM、约3.0mM、约4.0mM或约5.0mM的MTG或半胱氨酸。在实施方式中,轻度还原剂包含终浓度约1mM的MTG或半胱氨酸。

[0221] 在实施方式中,将轻度还原剂和解聚剂添加到在缓冲液(如PBS、Tris或Hepes)中的纯化的二聚化CSP或聚集的CSP中,并于室温(约21 $^{\circ}$ C)下混合。在实施方式中,所述解聚剂是精氨酸、盐酸胍、去垢剂或任何其它已知的解聚剂。在实施方式中,所述轻度还原剂是MTG和解聚剂是尿素。在实施方式中,优先还原条件包含缓冲液中的MTG和尿素。在实施方式中,所述缓冲液是Hepes、PBS、Tris或任何其他合适的缓冲液。在实施方式中,优先还原条件包含Hepes中的1.0mM的MTG和2M的尿素。在实施方式中,在纯化过程中较早地添加解聚剂,例如,在细胞破坏之前,如本文中别处所述。在这些实施方式中,当添加轻度还原剂以引发rCSP二聚体的优先还原时,解聚剂已经以足够的浓度存在。例如,解聚剂是以约0.5M至约4M的浓度存在的尿素。在实施方式中,尿素的浓度为约2.5M、约3M、约1至约2M、约1至约2.5M、约1至约3M、约1.5至约2M、约1.5至约2.5M、约1.5至约3M、约2至约2.5M、约2至约3M或约2.5至约3M。

[0222] 在实施方式中,混合是在约21 $^{\circ}$ C下进行约8至约48小时。在实施方式中,混合进行约12至约24小时,或约16至约18小时。混合可通过,例如,用磁力搅拌棒和搅拌板快速搅拌、摇动板、顶置式搅拌器或使用蠕动泵在再循环二聚化CSP和还原剂的袋中进行。在实施方式中,在约1ml至约25L的总体积中进行优先还原条件。在实施方式中,体积为约100ml至约1L。在实施方式中,优先还原条件在约200-600ml的体积中进行。

[0223] 在某些实施方式中,优先还原条件使用从丁基650S色谱纯化的二聚体rCSP实现。

在其它实施方式中,优先还原条件对从陶瓷羟磷灰石色谱洗脱的rCSP二聚体级分进行。

[0224] 细菌细胞裂解物

[0225] 通过使用任何适当的已知破坏方法(包括物理的或机械的细胞破坏方法和非机械的细胞破坏方法)破坏表达重组蛋白的细菌细胞获得细菌细胞裂解物制剂。破坏方法在破坏过程的强度、所需要的设备和/或试剂及易用性而变化。细胞破坏方法的选择是基于,例如,破坏特定的细胞的难度和待处理的材料的量。用于破坏细菌细胞的优选方法是产生可用于下游纯化步骤以得到未变性的、未降解的重组蛋白质的细菌细胞裂解物的方法。

[0226] 提供用于破坏的细胞培养物

[0227] 在本发明的实施方式中,提供了来自表达重组蛋白质的培养物的细菌细胞用于破坏,例如,作为全细胞培养液、细胞悬液、细胞浆或细胞糊。在实施方式中,细胞存在于包含足以防止CSP聚集体形成的解聚剂的溶液中。在这些实施例中,CSP未变性,因此CSP的C-末端区域二硫键是完整的。在实施方式中,细菌细胞稀释以调节细胞:培养基或细胞:稀释剂的体积。

[0228] 在实施方式中,使用细菌宿主细胞的培养物来制成用于根据本发明的方法破坏的细胞糊。可以根据本领域已知的和文献中描述的方法从培养物制备细胞糊。例如,可通过经过离心收获整个发酵液并分离所得细胞团块和无细胞培养液制备细胞糊。在实施方式中,为发酵收获,通过以10,000x g离心90分钟收获整个发酵液。细胞糊可在-70℃至-80℃下进行冷冻。在实施方式中,细胞糊在含有足以防止CSP聚集而不使CSP变性的浓度的解聚剂的溶液中在破坏之前重构。在未变性的CSP中,C-末端区域二硫键是完整的。在实施方式中,解聚剂是尿素。在实施方式中,所述解聚剂是,例如,精氨酸、盐酸胍、去垢剂或本领域中已知的任何其他适当的解聚剂。在实施方式中,所述解聚剂是符合美国药典委员会(Rockville, MD)的标准的成分,如在美国药典-国家处方集(USP-NF)中公开的,或在美国以外的国家的类似标准,例如,如在国际药典(世界卫生组织)中公布的。在某些实施方式中,所述解聚剂是2M的尿素。在实施方式中,解聚剂包含终浓度约0.5M至约4M的尿素。在实施方式中,尿素的浓度为约2.5M、约3M、约1至约2M、约1至约2.5M、约1至约3M、约1.5至约2M、约1.5至约2.5M、约1.5至约3M、约2至约2.5M、约2至约3M或约2.5至约3M。在某些实施方式中,将2M的尿素和20mM的tris, pH 8.1±0.2的溶液用于细胞糊的重构。在实施方式中,将细胞糊重构至20%的固形物(重量/体积)。在实施方式中,将细胞糊重构至低于20%的固形物(重量/体积)。考虑在本发明的整个方法中使用解聚剂。

[0229] 如本文在实施例中所描述的,可以例如用不锈钢叶轮(Barnant Mixer Series 20, Barnant Co., Barrington, IL或LabMaster, 0-1800rpm, Lightnin, Rochester, NY)搅拌细胞糊和解聚剂缓冲溶液而不使溶液涡旋,直到所有的细胞解冻和该溶液均质化。确定适当地制备用于所需的细胞破坏方法的细胞的重构条件是在本领域工作人员的技能范围内。在其中使用微流匀质机对所述细胞进行机械破坏的实施方式中,颗粒大小是防止微流匀质机通道的可能的堵塞。

[0230] 在实施方式中,表达CSP的细菌宿主细胞的培养物以全细胞培养液的形式存在。在实施方式中,稀释培养液以形成20%(体积/体积)混合物。在实施方式中,稀释缓冲液包含解聚剂。在某些实施方式中,含有解聚剂的稀释缓冲液是3.1M尿素、31mM tris, pH 8.1±0.2,并添加以得到20%(v/v)细胞的2M尿素及20mM tris。

### [0231] 细胞破坏

[0232] 可以通过使用本领域中已知的任何合适的方法破坏细胞制备细菌细胞裂解物制剂。方法的确定可通过本领域技术人员进行,例如基于处理规模、再现性、由于破坏导致的对重组蛋白的潜在损害和计划的分离步骤所需的特定裂解物特性。本领域技术人员可以建立将产生最高质量产物的破坏方法的最小力。蛋白质质量的方面包括但不限于蛋白质二聚化或更高级聚集、蛋白质降解或蛋白质变性。这些方面可以通过本文所述的和本领域已知的方法进行评价。可以使用在已公开的文献中关于特定分离方法的指导来鉴定下游分离步骤所需的细胞裂解物制剂的特征。在实施方式中,对于包括盘栈离心的方法(例如,如本文中所述的),固形物不超过10%。在实施方式中,固形物不超过11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在分离步骤中可能重要的其它溶解物特征包括,但不限于,缓冲液组成、溶液粘度、裂解物的温度(因为它们影响离心机中的分离)。

[0233] 培养物可以在破坏之前OD-标准化。例如,细胞可以被标准化至约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20的OD<sub>600</sub>。

[0234] 用于破坏细胞的方法包括物理破坏(例如,机械细胞裂解、液体均质化、超声处理、冷冻/解冻和手动研磨)和渗透(例如,化学破坏、通过渗透冲击的破坏、酶促破坏和热破坏)。可使用用于破坏细胞以释放可溶性部分的任何适当的方法来制备可用于本发明方法中的细菌细胞裂解物,例如,如由Grabski, A.C., 2009, "Advances in preparation of biological extracts for protein purification," *Methods Enzymol.* 463:285-303; Hopkins, T.R., 1991, "Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins," *Bioprocess technology* 12:57-83; 和 Harrison, S.T., 1991, "Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products," *Biotechnology Advances* 9 (2):217-240描述的,通过引用将其全部并入本文。基于纯化的细胞和规模来选择适当的方法,了解可用方法的优点和缺点在本领域技术人员的技术能力范围内。例如,剧烈机械处理降低细胞裂解物的粘度但是可通过加热或氧化导致不稳定蛋白质的失活,而非机械处理(例如,细胞渗透)可以不从细胞释放靶蛋白,并且可以产生粘性细胞裂解物。取决于用于表达重组蛋白的细胞类型,细胞提取物可含有不同量的核酸、核糖体物质、脂质、分散的细胞壁多糖、碳水化合物、壳多糖、小分子和不需要的蛋白质(例如,宿主蛋白质)。产生可以有效地在下游纯化过程中操作而不灭活或降解重组蛋白的细菌细胞裂解物是关键。

[0235] 机械细胞破坏方法包括,例如,使用搅拌器或混合器、珠磨或珠打。液体均质化方法包括微流化以及使用,例如,Constant Cell Disruptor、Niro-Soavi均质化器、APV-Gaulin均质化器、Dounce Homogenizer、Potter-Elvehjem Homogenizer或French Press的均质化。其他物理破坏方法包括超声处理、冷冻/解冻和手工研磨。用于物理破坏的设备是市售可得的。

[0236] 在具体的实施方式中,细胞用微流匀质机机械破坏,例如,根据本文实施例中所描述的及如本领域中已知的和在文献中公开的方法。在这些实施方式中,在10000±1000psi下运行的Microfluidics M-110Y微流匀质机可用于破坏细胞。来自微流匀质机的裂解物可以通过壳管式换热器,其将溶液冷却至12℃以下,并根据本领域已知的任何方法来收集。

[0237] 在实施方式中,使用任何合适的微流匀质机。在实施方式中,加入至少一种试剂以

帮助细胞破坏过程。例如,细胞可以悬浮在低渗缓冲液中。以例如200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加的溶菌酶消化细菌细胞壁的多糖组分。在实施方式中,用玻璃珠处理细胞以促进细胞壁的破碎。在实施方式中,在纯化过程中的任何时间加入蛋白酶抑制剂。在某些实施方式中,在裂解之前或过程中加入蛋白酶抑制剂。

[0238] 通过渗透冲击的周质释放

[0239] 在实施方式中,使用如本文所述的周质前导序列将rCSP引导到周质,和通过渗透细胞壁生成细菌细胞裂解物。例如,在实施方式中,可以使用化学和/或酶促细胞裂解试剂,如细胞壁裂解酶和EDTA。在本发明的方法中也可以考虑使用冷冻的或先前存储的培养物。细胞可以通过渗透冲击渗透,例如,如在本文实施例中描述的或如本领域已知的和在文献中报道的。

[0240] 纯化重组CSP二聚体

[0241] 在本发明的方法中,将细菌细胞裂解物制剂中的rCSP二聚体与包括宿主细胞碎片和宿主细胞蛋白的杂质分离。在实施方式中,执行纯化以依次从细胞碎片和宿主细胞蛋白质分离rCSP。例如,首先可以将裂解物分离成可溶性和不溶性部分,然后将存在于可溶性部分中的rCSP二聚体与宿主细胞蛋白质和其它杂质分离。在其它实施方式中,在同一步骤或系列步骤中将rCSP二聚体与细胞碎片和宿主细胞蛋白分离。在实施方式中,使用膨胀床色谱,其中裂解物经过色谱床,这分离出细胞碎片和宿主细胞蛋白两者。膨胀床色谱后可以跟随额外的纯化步骤以除去残留的污染物。

[0242] 将细菌细胞裂解物制剂分离成可溶性和不溶性部分

[0243] 在本发明的纯化方法中,含有重组蛋白的细菌细胞裂解物制剂被分离成可溶性和不溶性部分。这一过程将碎片移除以澄清含有重组蛋白的可溶性部分。在实施方式中,将被分成可溶性和不溶性部分的细菌细胞裂解物制剂包含新裂解的细胞。在其它实施方式中,细菌细胞裂解物制剂在被分离为可溶性和不溶性部分之前进行一个或多个操作或处理。这些操作或澄清预处理可以包括处理以利于进一步的操作或根据需要增强重组蛋白回收率和质量。例如,可用至少一种试剂,例如,絮凝剂或凝结剂稀释或处理细菌细胞裂解物制剂。絮凝剂(包括硫酸铵和聚乙二醇)增强细菌细胞裂解物制剂的不溶性部分的沉淀,从而增强不溶性部分与可溶性部分的分离。在实施方式中,核酸酶,例如DNA酶(25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和/或RNA酶(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),被加入到细菌细胞裂解物制剂以降低其粘度。

[0244] 用于将细菌细胞裂解物分离为含有可溶性蛋白的可溶性部分和包含细胞碎片的不溶性部分的方法是本领域公知的。本领域中技术人员认为合适的用于分离液体和固体的任何方法或方法组合被考虑用于根据本发明的方法。可用的方法包括,但不限于离心、过滤、沉降和其它澄清方法以及它们的组合。在某些实施方式中,执行离心以将较大的细胞碎片颗粒与重组蛋白质分离,接着是分离较小的碎片颗粒的过滤方法。在某些实施方式中,在不存在离心或其他方法的情况下进行微滤。

[0245] 分离方法-可溶性和不溶性部分

[0246] 离心

[0247] 一种或多种离心方法可用于将细菌细胞裂解物分离为可溶性(液体)和不溶性(固体)部分。用于将细菌细胞裂解物分离为可溶性和不溶性部分的离心方法包括,例如,固定角离心、盘栈离心、管式转筒离心和使用落地离心机的批离心。



[0248] 可使用任何合适的设备和方法来进行离心。为了将可溶性部分与不溶性部分分离的目的的细胞培养物或裂解物的离心是本领域公知的,并在文献中被广泛描述,例如,在 *Methods in Enzymology* (1990), M.P.Deutscher编辑和Ausubel, F.M.等, 1991中。例如,可以以  $20800 \times g$  离心分离裂解的细胞20分钟(在  $4^{\circ}\text{C}$  下),用手动或自动液体处理将上清液除去。沉淀(不溶性)部分可以再悬浮于缓冲溶液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH 7.4中。可以使用例如设备如连接到顶置式搅拌器的叶轮、磁力搅拌棒、摇摆振动筛等进行再悬浮。

[0249] 在本发明的实施方式中,使用一系列的程序,例如,离心,随后一个或多个附加的离心程序或一个或多个过滤或沉降过程将细菌细胞裂解物分离成可溶性和不溶性部分。每个程序进一步澄清可溶性部分。

[0250] 在实施方式中,使用如本文所述的盘栈离心进行分离。在盘栈离心中,盘栈离心机在连续过程中将固体和一个或两个液相彼此分离。较致密的固形物被离心力推动向外,而密度较小的液相形成内部的同心层。在液相满足达到最大的分离效率之处插入特殊的板。可以间歇地或连续地手动移除固形物。澄清的液体在碗的顶部溢出到出口区域。不同的液体相可引导到单独的腔室和彼此密封以防止交叉污染。盘栈离心机可用于分离具有最小密度差异的相。

[0251] 在其中使用盘栈离心将细菌细胞裂解物制剂分离成可溶性和不溶性部分的本发明的实施方式中,用超Q纯化水或2M尿素, 20mM Tris, pH8.0, 1:1稀释20% (w/v或v/v) 裂解物,并通过用蠕动泵再循环或通过不锈钢叶轮充分混合,以产生均匀的10% (w/v或v/v) 裂解物。以  $15000 \times g$  操作盘栈离心机,例如, SC-6离心机(GEA Westfalia, Oelde, Germany)。使用蠕动泵和铂固化的硅橡胶管,将10%和20%的裂解物以0.3至1.0升/分钟的流速在15至  $22^{\circ}\text{C}$  的温度下进料到离心机。离心滤液反压保持在75至85psig。使得离心滤液在12至  $30^{\circ}\text{C}$  下经过和不经过热交换离开SC-6,并且可将其收集到聚丙烯容器或Flexboy®袋中。以确定的时间间隔和循环重复将不溶性部分/颗粒间断地排出。可以通过AF16单通道近红外(NIR)吸收计(Optek-Danulat, Germantown, WI)收集离心滤液的实时在线浊度,并报告为校准范围的百分比浓度单元(CU)。可以提取离心滤液的即时和整体样品用于使用Hach 2100p (Loveland, Colorado) 进行比浊度单位(NTU)测量。将浊度下降(1-NTU离心滤液/NTU进料)用于评估离心机的性能, >90%的降低是用于开始进一步优化的好水平。

[0252] 深度过滤

[0253] 在实施方式中,在离心后使用深度过滤澄清或进一步澄清细菌细胞裂解物制剂。在实施方式中,通过盘栈离心接着深度过滤进行可溶性和不溶性部分的分离。在其中使用深度过滤的实施方式中,利用深度和无菌过滤器的组合来除去小至  $0.2\mu\text{m}$  的颗粒。在某些实施方式中,评估深度和膜过滤器用来过滤上清液和离心滤液的适用性。在实施方式中,通过深度过滤器在18至  $28^{\circ}\text{C}$  下以50至100LMH泵送上清液和离心滤液(例如,10%细胞糊或全细胞培养液的裂解物)。在实施方式中,利用离心方法,例如,盘栈离心分离的细菌细胞裂解物制剂的可溶性部分以10psig泵送通过膜过滤器以建立  $V_{\text{max}}$  值。

[0254] 其中使用深度过滤将细菌细胞裂解物制剂分离成可溶性和不溶性部分的可用于本发明方法中的深度过滤器的非限制性实例是:Millipore C0HC、A1HC、B1HC和X0HC深度过滤器、CUNO 60ZA和CUNO 90ZA。可以基于例如以 <20升/平方米的进料负荷下的压力限制或浊度的降低评估过滤器。在实施方式中,可用来实施根据本发明方法的深度过滤的深度过

滤器的基体具有小孔和高电荷密度,并且不具有常常阻塞和导致压力故障的0.1微米的标称膜。在实施方式中,使用的过滤器显示 $\leq 30$ psi的压力降和/或达到40升/平方米进料负荷的浊度降低。在实施方式中,用来实施根据本发明方法的深度过滤的深度过滤器是Millipore X0HC过滤器。

[0255] 微过滤

[0256] 微过滤(MF)是在一个单元操作中移除固形物和提供可直接用于色谱法的进料流的可放大的方法。在实施方式中,使用微过滤分离可溶性和不溶性部分而没有在前的离心。在实施方式中,微过滤包括使用具有微米到亚微米范围内的孔的膜的切向流过滤(TFF)。在实施方式中,孔是0.22至0.45 $\mu\text{m}$ 。理想地,比膜孔尺寸大的颗粒如细胞碎片被保留(渗余物),而比膜孔尺寸小的那些随其它溶质和溶剂通过膜扩散(透过物)。对于rCSP的回收,需要的是通过浓缩和缓冲液交换保留细胞碎片在渗余物中和收集rCSP在透过物中。

[0257] 5%至20%(重量/体积)固形物的细菌细胞裂解物制剂可通过切向流过滤浓缩至40%(重量/体积)固形物和用2M尿素,20mM Tris/20mM的MES/20mM Bis-Tris pH 6-8渗滤1至3DV(渗滤体积(diavolume))。冻融过程

[0258] 在实施方式中,在进一步的处理步骤例如除去宿主细胞蛋白质的步骤之前,将裂解物是冷冻和解冻。根据体积,可以将裂解物分成等份用于更有效的冷冻。在实施方式中,每个裂解物等份在约19小时或更短时间内是100%固体。在实施方式中,每个裂解物等份在约18小时或更短时间、约18.1小时或更短时间、约18.2小时或更短时间、约18.3小时或更短时间、约18.4小时或更短时间、约18.5小时或更短时间、约18.6小时或更短时间、约18.7小时或更短时间、约18.8小时或更短时间或者约18.9小时或更短时间是100%固体。在实施方式中,每个裂解物等份在约7小时或更短时间、约6.9小时或更短时间、约6.8小时或更短时间、约6.7小时或更短时间、约6.6小时或更短时间、约6.5小时或更短时间、约6.4小时或更短时间、约6.3小时或更短时间、约6.2小时或更短时间、约6.1小时或更短时间或者约6小时或更短时间是至少约65%的固体。在实施方式中,每个裂解物等份在约5小时或更短时间、约4.9小时或更短时间、约4.8小时或更短时间、约4.7小时或更短时间、约4.6小时或更短时间、约4.5小时或更短时间、约4.4小时或更短时间、约4.3小时或更短时间、约4.2小时或更短时间、约4.1小时或更短时间或者约4小时或更短时间是至少约25%的固体。在实施方式中,裂解物等份是约1L至约2L。在实施方式中,裂解物被冷冻在1L或2L的PETG瓶中。

[0259] 在实施方式中,所述冻融过程包括在裂解物解冻之后保持在室温。在实施方式中,将所述裂解物在室温下保持至少约4到至少约7小时、至少约4.5到至少约7小时、至少约5到至少约7小时或者至少约5.5到至少约7小时,或者至少约6到至少约7小时,或者至少约6.5到至少约7小时、至少约4到至少约6小时、至少约4.5到至少约6个小时、至少约5到至少约6小时、或至少约5.5到至少约6小时。在实施方式中,裂解物在解冻之后在室温下保持约6小时。

[0260] 在实施方式中,冻融过程显著降低裂解物中高分子量的蛋白质物质或“梯状带”的存在。梯状带的存在可预测在随后的色谱步骤中的低rCSP产率。

[0261] 在实施方式中,在冻融处理后和在进一步的处理步骤前,通过将沉淀降低至允许成功完成色谱步骤,例如,TMAE色谱的水平的处理降低沉淀水平。例如,沉淀水平应足够低以允许正常色谱。在实施方式中,用于将沉淀减少到可接受的水平的方法不会导致与不使

用减少沉淀的处理相比增加的N-末端剪切。在实施方式中,解冻之后或解冻后保持在室温下之后通过膜过滤降低裂解物的沉淀物水平。在实施方式中,Sartobran P (0.45 $\mu$ m/0.2 $\mu$ m)膜过滤器被用于裂解物的膜过滤。在实施方式中,这样的过滤过程是在纯化过程的任何步骤处进行。在实施方式中,rCSP在最后的柱之后和缓冲液交换步骤前进行膜过滤。

#### [0262] rCSP与可溶性部分中的宿主细胞蛋白分离

[0263] 用于将重组蛋白与宿主细胞蛋白分离的方法和根据重组蛋白的特征所选择的一种或多种分离方法的使用是本领域已知的并被详细描述于文献中,例如,由M.P.Deutscher编辑的Methods in Enzymology (1990)中。可以根据重组蛋白质和污染物的性质(例如,大小、电荷、结合特性和溶解度)的差异来选择分离方法。基于这些参数的方案可以包括亲和色谱、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、疏水相互作用色谱和混合模式色谱。在实施方式中,分离方法用于浓缩重组蛋白质。

[0264] 本文描述了示例性的分离方法,但是在实施方式中,用于将rCSP与宿主细胞蛋白质、不需要的rCSP种类或其它杂质分离和/或用于浓缩重组蛋白质的任何已知的方法或方法的组合被视为适当时使用。理想的分离方法导致在如本文所述的rCSP二聚体的优先还原之后纯化未降解、非变性的CSP单体。在实施方式中,所获得的rCSP(单体)进一步与其余的杂质包括宿主细胞蛋白质分离。

#### [0265] 色谱

[0266] 在实施方式中,色谱被用于将rCSP二聚体与通过分离细菌细胞裂解物制剂得到的可溶性部分中存在的宿主细胞蛋白质、不需要的rCSP种类或或其它杂质分离。在实施方式中,在色谱过程中存在低浓度的解聚剂以防止聚集而不还原二聚体中的分子间二硫键(其连接单体),进而不变性CSP的分子内二硫键。在实施方式中,低浓度的解聚剂为约2M的尿素。在某些实施方式中,细菌细胞裂解物的可溶性部分存在于20mM Tris,pH8.0和2M尿素中。

[0267] 许多类型的色谱是本领域已知的和被描述在文献中,例如,由M.P.Deutscher编辑的Methods in Enzymology (1990)中。

[0268] 在实施方式中,使用离子交换色谱法。在离子交换色谱法,例如,阴离子交换或阳离子交换色谱中,重组蛋白结合于固定的装料,例如,在基质如柱上。当重组蛋白质固定时,未固定的污染物被除去。之后重组蛋白从固定的装料洗脱或移置。在实施本发明的方法中有用的基质或离子交换剂是本领域已知的,且包括但不限于纤维素、葡聚糖、琼脂糖和聚苯乙烯。用于离子交换色谱法,例如,批式离子交换色谱法的任何尺寸的柱或任何其它合适的已知系统被考虑用于本发明的方法。在实施方式中,使用阴离子交换色谱、阳离子交换色谱或两者。

[0269] 疏水相互作用色谱(HIC)是基于固定相和待分离组分之间的疏水性相互作用。HIC的方法包括疏水性固定相和极性流动相。极性组分有利于流动相和首先洗脱。随着化合物的疏水特性提高,保留时间变长。通常,流动相的极性越低,其洗脱物强度越高。吸附和解吸分别通过增加或减少液体的盐浓度或改变配体和/或通过改变pH值使吸附/解吸的物质上的电荷变化支持。HIC方法被描述在文献中,如W0 96/00735,“Hydrophobic Chromatographic Resins with Ionizable Groups”、W0 96/09116和5,652,348号美国专利,“Chromatographic Resins and Methods for Using Same”,其全部以引用的方式整体

并入本文中。疏水性相互作用分离方法可以是基于亲硫的吸附剂,如被描述于,例如,8,138,306号美国专利,“Separation Method”,其全文以引用方式并入本文。8,138,306号美国专利还描述了使用包括拥有四极或偶极矩的不带电荷的配体的分离基质。

[0270] 在本发明的实施方式中,用任何合适的疏水性基团,例如,己基、苯基、辛基或丁基来进行rCSP二聚体或单体的HIC。疏水性树脂是可商购的,并且包括,例如,己基650C(Tosoh USA)、苯基HP(GE,17-5195-01)、丁基HP(GE,28-4110-01)、PPG 600M(Tosoh USA)和MEP HyperCel(Pall)。在实施方式中,在轻度还原步骤(优先还原条件下)开始之后进行HIC。在实施方式中,HIC纯化步骤成功地将宿主细胞蛋白质水平降低至最多500ppm、最多450ppm、最多400ppm、最多350ppm、最多300ppm、最多250ppm、最多200ppm、最多150ppm、最多100ppm、最多50ppm、最多40ppm、最多30ppm、最多20ppm、最多10ppm、最多5ppm或至不可检测的水平。在实施方式中,HIC纯化步骤成功地将宿主细胞蛋白质水平降低至最多50ppm、最多40ppm、最多30ppm、最多20ppm或最多10ppm,如通过ELISA所检测的。在实施方式中,在HIC纯化步骤后观察到的rCSP的N-末端剪切为最多5%、最多4%、最多3%、最多2%、最多1.5%、最多1%、最多0.5%或不可检测。在实施方式中,HIC纯化步骤导致至少98%、至少98.5%、至少99%或至少99.5%纯度的rCSP。在实施方式中,HIC纯化步骤导致rCSP浓度为至少约0.1mg/ml至约2mg/ml。在实施方式中,HIC纯化步骤导致rCSP浓度为至少约0.15mg/ml至约2mg/ml、至少约0.2mg/ml至约2mg/ml、至少约0.25mg/ml至约2mg/ml、至少约0.3mg/ml至约2mg/ml、至少约0.35mg/ml至约2mg/ml、至少约0.4mg/ml至约2mg/ml、至少约0.45mg/ml至约2mg/ml、至少约0.5mg/ml至约2mg/ml、至少约0.1mg/ml至约1mg/ml、至少约0.15mg/ml至约1mg/ml、至少约0.2mg/ml至约1mg/ml、至少约0.25mg/ml至约1mg/ml、至少约0.3mg/ml至约1mg/ml、至少约0.35mg/ml至约1mg/ml、至少约0.4mg/ml至约1mg/ml、至少约0.45mg/ml至约1mg/ml、至少约0.5mg/ml至约1mg/ml。在某些实施方式中,所述的HIC纯化步骤将宿主细胞蛋白质的水平降低至最多50ppm,和N-末端剪切为至多1%。

[0271] 在实施方式中,HIC用于将不需要的rCSP种类,例如,N-末端剪切种类与全长种类分离。在实施方式中,除去的不需要的种类包括,例如,高分子量的聚集体、二聚化的种类和变性种类。在实施方式中,HIC增加总rCSP约5至约15%,如通过RP-HPLC测定的。在实施方式中,所述增加为约8至约12%、约9至约11%、至少约8%、至少约9%、至少约10%、至少约11%或至少约12%。

[0272] 在实施方式中,使用己基650C柱,用梯度洗脱或分步洗脱实施HIC。在实施方式中,使用己基650C柱,用0.5至0M或1.0至0M硫酸铵梯度洗脱,在用MTG还原之后进行HIC。

[0273] 色谱方法也可以基于配体和待分离化合物之间的亲合性进行。有用的亲合性的例子是抗原-抗体亲合性、金属离子亲和性及受体-配体亲和力。蛋白质可基于大小,通过尺寸排阻色谱法进行分离。尺寸排阻方法包括,例如,凝胶过滤。

[0274] 混合模式色谱方法基于分离参数的组合分离蛋白质。例如,两种或更多种已知的离子交换分离原理的组合已被表示为混合模式离子交换剂。见例如W0 97/29825,“Process for Chromatographic Separation of Peptides and Nucleic Acid, and New High Affinity Ion Exchange Matrix”,其描述了混合模式阴离子交换剂。

[0275] 高盐配体(HSL)描述于,例如,8,138,306号美国专利中。可以作为混合模式阳离子交换配体发挥作用,并已被证明在工业应用如蛋白质纯化中是有益的,因为它们可以耐

受高盐浓度,并因此不需要样品的大幅稀释。

[0276] 在本发明的实施方式中,混合模式色谱被用于从宿主细胞蛋白分离rCSP。在具体实施方式中,使用羟基磷灰石色谱法。在实施方式中,负责CSP的N-末端剪切的宿主细胞蛋白酶通过羟基磷灰石色谱与rCSP分离。在实施方式中,TMAE装料被用在羟基磷灰石色谱中。

[0277] 羟基磷灰石色谱法是使用不溶性的羟基化磷酸钙 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (其形成基质和配体)纯化蛋白质的方法。官能团由带正电的钙离子(C-位点)和带负电的磷酸基团的簇(P-位点)的对组成。羟基磷灰石和蛋白质之间的相互作用是复杂和多模式的。在相互作用的一种方法中,蛋白质上的带正电的氨基基团与带负电的P-位点相关联,并且蛋白质的羧基基团通过配位络合作用与C位点相互作用。酸性和碱性蛋白通常通过不同的机制与CHA树脂相互作用:酸性蛋白通常通过与羧基基团的配位键结合于C-位点,而碱性蛋白通过与胺基团的电荷相互作用结合至P-站点。陶瓷羟基磷灰石(cHA)色谱法克服了与晶体羟基磷灰石相关的一些困难,诸如有限的流率。陶瓷羟基磷灰石具有高耐久性、良好的蛋白结合能力,并且相比于晶体羟基磷灰石可以以更高的流速和压力使用。可以以几种不同的模式,如结合模式、流通模式或组合结合/流通模式进行使用cHA的色谱分离。使用陶瓷羟基磷灰石色谱的方法被描述于,例如,8,058,407号美国专利,“Purification of acidic proteins using ceramic hydroxyapatite chromatography”,其整体通过引用引入本文。

#### [0278] 缓冲液交换

[0279] 在实施方式中,在优先还原处理开始后进行缓冲液交换。缓冲液交换可以去除某些不需要的试剂,例如,不需要的还原剂。在实施方式中,缓冲液交换除去盐、尿素和/或DTT。不会使rCSP容易地形成较高分子量的聚集体(例如,四聚体、六聚体和低聚物)的任何缓冲液交换方法可用于本发明的方法中。在实施方式中,缓冲液交换通过渗滤方法,例如,凝胶过滤(脱盐)色谱法或用UF/DF膜的切向流过滤(TFF)进行。在实施方式中,用约5至约10kDa的MWC0的UF/DF膜使用TFF进行缓冲液交换。在实施方式中,UF/DF膜为约5至约9kDa MWC0、约5至约8kDa MWC0,约5至约7kDa MWC0或约5至约6kDa MWC0。在某些实施方式中,用约5kDa MWC0的UF/DF膜使用TFF进行缓冲液交换。在实施方式中,在产物引入之前,用1×PBS使膜平衡。在实施方式中,rCSP被交换到其中rCSP稳定的缓冲液中。

[0280] 在实施方式中,以324LMH(升/平方米/小时)和720LMH在约21°C至23°C下将所述轻度还原的(单聚化的(monomerized))rCSP跨膜再循环。在实施方式中,将保持rCSP稳定性的制剂缓冲液跨膜再循环。在实施方式中,将1×PBS,10%(w/v)的精氨酸-HCl(0.5M精氨酸-HCl)(购自,例如,J.T.Baker,部件编号2067),1mM的单硫代甘油(购自,例如,MP BIOMEDICALS,Santa Ana,CA,目录号155727,或Research Organic,Cleveland,OH,目录号0178M),pH 6.4在室温(21-23°C)下以324LMH跨膜再循环。在实施方式中,在5kDa的膜上时将21-24psi的TMP施加于渗滤物(渗滤负荷)。在实施方式中,在5kDa的膜上时将10-15psi和21-24psi的TMP施加于渗滤物。在实施方式中,进行多个(例如,5至10个)渗滤物体积(渗滤体积)的恒定体积渗滤。在实施方式中,在几个渗滤体积,例如,3至10个渗滤体积后,渗余物被浓缩2倍和渗滤另外几个渗滤体积,例如,3至10个渗滤体积。渗余物被浓缩和稀释至1.0mg/ml。最终纯化的rCSP被冷冻储存在-80°C下。

#### [0281] rCSP稳定液体制剂

[0282] 最终纯化的rCSP可渗滤到液体制剂缓冲液中以产生rCSP稳定液体制剂。在实施方

式中,rCSP稳定液体制剂使得rCSP能够被稳定地保持在高浓度。在实施方式中,在液体制剂缓冲液中的rCSP在储存过程中保留其物理和化学稳定性。可在选定的时间周期后在给定的温度下对rCSP液体制剂的稳定性进行评估。rCSP稳定性的负指示剂(或不稳定性指示剂)包括,例如,rCSP单体的量或百分比的降低(%总rCSP)、二聚体的量或百分比的增加、聚集体的增加、降解产物的增加、变性的增加、确定为活性的rCSP的百分比或分数的降低。在实施方式中,如本文所述的rCSP质量的指示剂用来指示稳定性,因为稳定性可以被认为是随时间的质量的量度。类似地,rCSP稳定性指示剂也可以用于指示rCSP质量。在实施方式中,在稳定液体制剂中的rCSP稳定性是通过最小量的rCSP单体的存在或维持所指示的,例如,总蛋白质的至少约80%至约100%。在实施方式中,rCSP稳定性是通过存储至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天、至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年时,存在或保持约81%至约100%、约82%至约100%、约83%至约100%、约84%至约100%、约85%至约100%、约86%至约100%、约87%至约100%、约88%至约100%、约89%至约100%、约90%至约100%、约91%至约100%、约92%至约100%、约93%至约100%、约94%至约100%、约95%至约100%、约96%至约100%、约97%至约100%、约98%至约100%、约99%至约100%、约80%至约99%、约81%至约99%、约82%至约99%、约83%至约99%、约84%至约99%、约85%至约99%、约86%至约99%、约87%至约99%、约88%至约99%、约89%至约99%、约90%至约99%、约91%至约99%、约92%至约99%、约93%至约99%、约94%至约99%、约95%至约99%、约96%至约99%、约97%至约99%、约98%至约99%、约80%至约98%、约81%至约98%、约82%至约98%、约83%至约98%、约84%至约98%、约85%至约98%、约86%至约98%、约87%至约98%、约88%至约98%、约89%至约98%、约90%至约98%、约91%至约98%、约92%至约98%、约93%至约98%、约94%至约98%、约95%至约98%、约96%至约98%、约97%至约98%、约80%至约97%、约81%至约97%、约82%至约97%、约83%至约97%、约84%至约97%、约85%至约97%、约86%至约97%、约87%至约97%、约88%至约97%、约89%至约97%、约90%至约97%、约91%至约97%、约92%至约97%、约93%至约97%、约94%至约97%、约95%至约97%、约96%至约97%、约80%至约96%、约81%至约96%、约82%至约96%、约83%至约96%、约84%至约96%、约85%至约96%、约86%至约96%、约87%至约96%、约88%至约96%、约89%至约96%、约90%至约96%、约91%至约96%、约92%至约96%、约93%至约96%、约94%至约96%、约95%至约96%、约80%至约95%、约81%至约95%、约82%至约95%、约83%至约95%、约84%至约95%、约85%至约95%、约86%至约95%、约87%至约95%、约88%至约95%、约89%至约95%、约90%至约95%、约91%至约95%、约92%至约95%、约93%至约95%、约94%至约95%、约80%至约94%、约81%至约94%、约82%至约94%、约83%至约94%、约84%至约94%、约85%至约94%、约86%至约94%、约87%至约94%、约88%至约94%、约89%至约94%、约90%至约94%、约91%至约94%、约92%至约94%、约93%至约94%、约80%至约93%、约81%至约93%、约82%至约93%、约83%至约93%、约84%至约93%、约85%至约93%、约86%至约93%、约87%至约93%、约88%至约93%、约89%至约93%、约90%至约93%、约91%至约93%、约92%至约93%

93%、约80%至约92%、约81%至约92%、约82%至约92%、约83%至约92%、约84%至约92%、约85%至约92%、约86%至约92%、约87%至约92%、约88%至约92%、约89%至约92%、约90%至约92%、约91%至约92%、约80%至约91%、约81%至约91%、约82%至约91%、约83%至约91%、约84%至约91%、约85%至约91%、约86%至约91%、约87%至约91%、约88%至约91%、约89%至约91%、约90%至约91%、约80%至约90%、约81%至约90%、约82%至约90%、约83%至约90%、约84%至约90%、约85%至约90%、约86%至约90%、约87%至约90%、约88%至约90%、约89%至约90%、约80%至约89%、约81%至约89%、约82%至约89%、约83%至约89%、约84%至约89%、约85%至约89%、约86%至约89%、约87%至约89%、约88%至约89%、约80%至约88%、约81%至约88%、约82%至约88%、约83%至约88%、约84%至约88%、约85%至约88%、约86%至约88%、约87%至约88%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%的rCSP单体所指示的。可以如本文所述的或通过本领域中已知的任何适当的方法,例如,SE-HPLC来测定rCSP单体的量。在存储之前的rCSP单体的量可用于对比。

[0283] 在实施方式中,在稳定液体制剂中的rCSP稳定性通过rCSP单体的最大减少率指示,例如,存储超过约9天到一年减少小于或等于约10%。在实施方式中,当存储至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、在至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天、至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年时,在稳定液体制剂中的rCSP单体的量减少不超过约0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在某些实施方式中,rCSP稳定性通过当存储约9天至约25天时rCSP单体的小于或等于约1%至约3%或至约5%的最大减少率指示。在某些实施方式中,rCSP稳定性通过当存储约9天至约25天时rCSP单体的小于或等于约1%的最大减少率指示。

[0284] 在实施方式中,在稳定液体制剂中的rCSP稳定性通过例如,不超过rCSP二聚体、聚集的种类、变性的种类或降解产物的量的最大增加指示。在实施方式中,当存储至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、在至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天、至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年时,稳定液体制剂中rCSP二聚体、聚集的种类、变性的种类和/或降解产物的量增加不超过约0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、6%、7%、8%、9%或10%。在某些实施方式中,rCSP稳定性通过当存储至少约20或25天时rCSP二聚体、聚集的种类、变性的种类和/或降解产物的小于或等于约1%至约3%或至约5%的最大增加率指示。在某些实施方式中,rCSP稳定性通过当存储至少约20或25天时聚集的种类的小于或等于约1%的最大增加率指示。在某些实施方式中,rCSP稳定性通过当存储至少约20或25天时降解产物的小于或等于约5%的最大增加率指示。在实施方式中,rCSP稳定性由存在小于10%的rCSP二聚体、聚集的种类、变性的种类或降解产物指示。在实施方式中,rCSP稳定性由获得的总蛋白或纯化CSP中存在不超过10%、

不超过9%、不超过8%、不超过7%、不超过6%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%或不超过1%的rCSP二聚体、聚集的种类、变性类型或降解产物指示。rCSP二聚体、聚集的种类或降解产物的量可以通过本文描述的方法或通过本领域中已知的任何适当的方法，例如，SE-HPLC来测定。存储前(例如，在T=0时)的量可用于对比。

[0285] 在实施方式中，rCSP的稳定维持由检测到的总rCSP的量、与对照相比时总rCSP中的相对百分比差异或与对照相比时rCSP纯度的相对百分比差异指示。在实施方式中，rCSP的稳定维持由检测到的约70%至约95%的总rCSP量、由与对照相比时总rCSP中不大于约-5至约5%的相对百分比差异或当与对照相比时rCSP纯度的不大于约-5%至约5%的相对百分比差异指示。在实施方式中，当与对照相比时，总rCSP中的相对百分比差异或rCSP纯度的相对百分比差异为约-5%至约5%、约-4%至约4%、约-3%至约3%、约-2%至约2%、约-2%至约1%、约-2%至约0.5%、约-2%到约0%或约0%至约2%。在实施方式中，对照是零时间点或存储于-80℃的样品。

[0286] 在实施方式中，检测到的总rCSP的量是约70%至约95%、约70%至约90%、约70%至约85%、约70%至约80%、约75%至约95%、约75%至约90%、约75%至约85%、约80%至约95%、约80%至约90%、约85%至约95%、约72%至约92%、约70%、约11%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%。

[0287] 在实施方式中，所述rCSP在约4℃至约25℃下稳定地维持在稳定液体制剂中。在实施方式中，所述rCSP在约4℃至约25℃、约4℃至约24℃、约4℃至约23℃、约4℃至约22℃、约4℃至约21℃、约4℃至约20℃、约4℃至约19℃、约4℃至约18℃、约4℃至约17℃、约4℃至约16℃、约4℃至约15℃、约4℃至约14℃、约4℃至约13℃、约4℃至约12个℃、约4℃至约11℃、约4℃至约10℃、约4℃至约9℃、约4℃至约8℃、约4℃至约7℃、约4℃至约6℃或约4℃至约5℃下被维持在稳定液体制剂中。在某些实施方式中，所述rCSP在约4℃下被稳定地维持在稳定液体制剂中。

[0288] 在实施方式中，将rCSP以高浓度维持在稳定液体制剂，例如，以至少约1mg/ml至约50mg/ml的浓度。在实施方式中，将rCSP以至少约1mg/ml、至少约1.5mg/ml、至少约2mg/ml、至少约2.5mg/ml、至少约3mg/ml、至少约3.5mg/ml、至少约4mg/ml、至少约4.5mg/ml、至少约5mg/ml、至少约6mg/ml、至少约7mg/ml、至少约8mg/ml、至少约9mg/ml、至少约10mg/ml、至少约15mg/ml、至少约20mg/ml、至少约25mg/ml、至少约30mg/ml、至少约35mg/ml、至少约40mg/ml、至少约45mg/ml、至少约50mg/ml、约2至约50mg/ml、约3至约50mg/ml、约4至约50mg/ml、约5至约50mg/ml、约10至约50mg/ml、约15至约50mg/ml、约20至约50mg/ml、约30至约50mg/ml、约40至约50mg/ml、约2至约40mg/ml、约3至约40mg/ml、约4至约40mg/ml、约5至约40mg/ml、约10至约40mg/ml、约15至约40mg/ml、约20至约40mg/ml、约30至约40mg/ml、约2至约30mg/ml、约3至约30mg/ml、约4至约30mg/ml、约5至约30mg/ml、约10至约30mg/ml、约15至约30mg/ml、约20至约30mg/ml、约2至约20mg/ml、约3至约20mg/ml、约4至约20mg/ml、约5至约20mg/ml、约10至约20mg/ml、约15至约20mg/ml、约2至约15mg/ml、约3至约15mg/ml、约4至约15mg/ml、约5至约15mg/ml、约10至约15mg/ml、约2至约10mg/ml、约3至约10mg/ml、约4至约10mg/ml、约5至约10mg/ml、约6至约10mg/ml、约7至约10mg/ml、约8至约10mg/ml、约9至约



10mg/ml、约1至约9mg/ml、约2至约9mg/ml、约3至约9mg/ml、约4至约9mg/ml、约5至约9mg/ml、约6至约9mg/ml、约7至约9mg/ml、约8至约9mg/ml、约1至约8mg/ml、约2至约8mg/ml、约3至约8mg/ml、约4至约8mg/ml、约5至约8mg/ml、约6至约8mg/ml、约7至约8mg/ml、约1至约7mg/ml、约2至约7mg/ml、约3至约7mg/ml、约4至约7mg/ml、约5至约7mg/ml、约6至约7mg/ml、约1至约6mg/ml、约2至约6mg/ml、约3至约6mg/ml、约4至约6mg/ml、约5至约6mg/ml、约1至约5mg/ml、约2至约5mg/ml、约3至约5mg/ml、约4至约5mg/ml、大约1至约4mg/ml、约2至约4mg/ml、约3至约4mg/ml、约1至约3mg/ml、约2至约4mg/ml或约1至约2mg/ml的浓度维持在稳定剂中。

[0289] 在实施方式中，rCSP稳定液体制剂包含轻度还原剂，例如，DTT、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油 (MTG)、巯基乙酸盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇 (B-巯基乙醇)、TCEP-HCl (纯结晶三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐) 或2-巯基乙胺-HCl (2-MEA) 或本领域中已知的任何其它合适的还原剂。在实施方式中，所述轻度还原剂是DTT、MTG、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、巯基乙酸或半胱氨酸。在实施方式中，所述轻度还原剂是MTG、半胱氨酸或乙酰半胱氨酸。在实施方式中，所述轻度还原剂是终浓度为约0.5mM至约4mM、约0.5mM至约3mM、约0.5mM至约2mM、约0.5mM至约1mM、约0.6mM至约2mM、约0.6mM至约1.5mM、约0.6mM至约1.4mM、约0.6mM至约1.3mM、约0.6mM至约1.2mM、约0.6mM至约1.1mM、约0.6mM至约1.05mM、约0.6mM至约1mM、约0.7mM至约2mM、约0.7mM至约1.5mM、约0.7mM至约1.4mM、约0.7mM至约1.3mM、约0.7mM至约1.2mM、约0.7mM至约1.1mM、约0.7mM至约1.05mM、约0.7mM至约1mM、约0.8mM至约2mM、约0.8mM至约1.5mM、约0.8mM至约1.4mM、约0.8mM至约1.3mM、约0.8mM至约1.2mM、约0.8mM至约1.1mM、约0.8mM至约1.05mM、约0.8mM至约1mM、约0.9mM至约2mM、约0.9mM至约1.5mM、约0.9mM至约1.4mM、约0.9mM至约1.3mM、约0.9mM至约1.2mM、约0.9mM至约1.1mM、约0.9mM至约1.05mM、约0.9mM至约1mM、约1mM至约1.5mM、约1mM至约1.4mM、约1mM至约1.3mM、约1mM至约1.2mM、约1mM至约1.1mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、约1.0mM、约1.1mM、约1.2mM、约1.3mM、约1.4mM、约1.5mM、约1.6mM、约1.7mM、约1.8mM、约1.9mM、约2.0mM、约3.0mM、约4.0mM或约5.0mM的MTG。

[0290] 在实施方式中，所述rCSP稳定液体制剂包含解聚剂。在实施方式中，所述解聚剂是精氨酸、盐酸胍、去垢剂、尿素或本领域中已知的任何其他适当的解聚剂。在实施方式中，所述制剂包含至少约1%至约25%w/v的精氨酸。在实施方式中，储存或制剂缓冲液包含约1%至约24%w/v的精氨酸、约1%至约23%w/v的精氨酸、约1%至约22%w/v的精氨酸、约1%至约21%w/v的精氨酸、约1%至约20%w/v的精氨酸、约1%至约19%w/v的精氨酸、约1%至约18%w/v的精氨酸、约1%至约17%w/v的精氨酸、约1%至约16%w/v的精氨酸、约1%至约15%w/v的精氨酸、约1%至约14%w/v的精氨酸、约1%至约13%w/v的精氨酸、约1%至约12%w/v的精氨酸、约1%至约11%w/v的精氨酸、约1%至约10%w/v的精氨酸、约1%至约9%w/v的精氨酸、约1%至约8%w/v的精氨酸、约1%至约7%w/v的精氨酸、约1%至约6%w/v的精氨酸、约1%至约5%w/v的精氨酸、约5%至约24%w/v的精氨酸、约5%至约23%w/v的精氨酸、约5%至约22%w/v的精氨酸、约5%至约21%w/v的精氨酸、约5%至约20%w/v的精氨酸、约5%至约19%w/v的精氨酸、约5%至约18%w/v的精氨酸、约5%至约17%w/v的精氨酸、约5%至约16%w/v的精氨酸、约5%至约15%w/v的精氨酸、约5%至约14%w/v的精氨酸、约5%至约13%w/v的精氨酸、约5%至约12%w/v的精氨酸、约5%至约11%w/v的精氨酸、

酸、约5%至约10%w/v的精氨酸、约7%至约24%w/v的精氨酸、约7%至约23%w/v的精氨酸、约7%至约22%w/v的精氨酸、约7%至约21%w/v的精氨酸、约7%至约20%w/v的精氨酸、约7%至约19%w/v的精氨酸、约7%至约18%w/v的精氨酸、约7%至约17%w/v的精氨酸、约7%至约16%w/v的精氨酸、约7%至约15%w/v的精氨酸、约7%至约14%w/v的精氨酸、约7%至约13%w/v的精氨酸、约7%至约12%w/v的精氨酸、约7%至约11%w/v的精氨酸、约7%至约10%w/v的精氨酸、约8%至约24%w/v的精氨酸、约8%至约23%w/v的精氨酸、约8%至约22%w/v的精氨酸、约8%至约21%w/v的精氨酸、约8%至约20%w/v的精氨酸、约8%至约19%w/v的精氨酸、约8%至约18%w/v的精氨酸、约8%至约17%w/v的精氨酸、约8%至约16%w/v的精氨酸、约8%至约15%w/v的精氨酸、约8%至约14%w/v的精氨酸、约8%至约13%w/v的精氨酸、约8%至约12%w/v的精氨酸、约8%至约11%w/v的精氨酸、约8%至约10%w/v的精氨酸、约9%至约24%w/v的精氨酸、约9%至约23%w/v的精氨酸、约9%至约22%w/v的精氨酸、约9%至约21%w/v的精氨酸、约9%至约20%w/v的精氨酸、约9%至约19%w/v的精氨酸、约9%至约18%w/v的精氨酸、约9%至约17%w/v的精氨酸、约9%至约16%w/v的精氨酸、约9%至约15%w/v的精氨酸、约9%至约14%w/v的精氨酸、约9%至约13%w/v的精氨酸、约9%至约12%w/v的精氨酸、约9%至约11%w/v的精氨酸、约9%至约10%w/v的精氨酸、约10%至约24%w/v的精氨酸、约10%至约23%w/v的精氨酸、约10%至约22%w/v的精氨酸、约10%至约21%w/v的精氨酸、约10%至约20%w/v的精氨酸、约10%至约19%w/v的精氨酸、约10%至约18%w/v的精氨酸、约10%至约17%w/v的精氨酸、约10%至约16%w/v的精氨酸、约10%至约15%w/v的精氨酸、约10%至约14%w/v的精氨酸、约10%至约13%w/v的精氨酸、约10%至约12%w/v的精氨酸、约10%至约11%w/v的精氨酸、约11%至约24%w/v的精氨酸、约11%至约23%w/v的精氨酸、约11%至约22%w/v的精氨酸、约11%至约21%w/v的精氨酸、约11%至约20%w/v的精氨酸、约11%至约19%w/v的精氨酸、约11%至约18%w/v的精氨酸、约11%至约17%w/v的精氨酸、约11%至约16%w/v的精氨酸、约11%至约15%w/v的精氨酸、约11%至约14%w/v的精氨酸、约11%至约13%w/v的精氨酸、约11%至约12%w/v的精氨酸、约12%至约24%w/v的精氨酸、约12%至约23%w/v的精氨酸、约12%至约22%w/v的精氨酸、约12%至约21%w/v的精氨酸、约12%至约20%w/v的精氨酸、约12%至约19%w/v的精氨酸、约12%至约18%w/v的精氨酸、约12%至约17%w/v的精氨酸、约12%至约16%w/v的精氨酸、约12%至约15%w/v的精氨酸、约12%至约14%w/v的精氨酸或约12%至约13%w/v的精氨酸。在某些实施方式中，存储缓冲液包含约10%的精氨酸。

[0291] 在实施方式中，所述rCSP稳定液体制剂包含缓冲剂。在实施方式中，所述缓冲液是PBS、Hepes、组氨酸或Tris缓冲液。在实施方式中，所述缓冲液是1×PBS或0.5×PBS。在实施方式中，稳定的rCSP制剂的pH为约6.0至约7.5。在实施方式中，稳定rCSP制剂的pH为约pH 6.0、约pH 6.1、约pH 6.2、约pH 6.3、约pH 6.4、约pH 6.5、约pH 6.6、约pH 6.7、约pH 6.8、约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3、约pH 7.4或约pH 7.5。在实施方式中，稳定的rCSP制剂的pH为约pH 6.0至约pH 7.4、约pH 6.0至约pH 7.3、约pH 6.0至约pH 7.2、约pH 6.0至约pH 7.1、约pH 6.0至约pH 7.0、约pH 6.0至约pH 7.5、约pH 6.0至约pH 7.4、约pH 6.0至约pH 7.3、约pH 6.0至约pH 7.2、约pH 6.0至约pH 7.1、约pH 6.0至约pH 7.0、约pH 6.0至约pH 6.9、约pH 6.0至约pH 6.8、约pH 6.0至约pH 6.7、约pH 6.0至约pH 6.6、约pH

6.0至约pH 6.5、约pH 6.1至约pH 7.5、约pH 6.1至约pH 7.4、约pH 6.1至约pH 7.3、约pH 6.1至约pH 7.2、约pH 6.1至约pH 7.1、约pH 6.1至约pH 7.0、约pH 6.1至约pH 6.9、6.1至约pH 6.8、约pH 6.1至约pH 6.7、约pH 6.1至约pH 6.6、约pH 6.1至约pH 6.5、约pH 6.2至约pH 7.5、约pH 6.2至约pH 7.4、约pH 6.2至约pH 7.3、约pH 6.2至约pH 7.2、约pH 6.2至约pH 7.1、约pH 6.2至约pH 7.0、6.2至约pH 6.9、约pH 6.2至约pH 6.8、约pH 6.2至约pH 6.7、约pH 6.2至约pH 6.6、约pH 6.0至约pH 6.5、约pH 6.3至约pH 7.5、约pH 6.3至约pH 7.4、约pH 6.3至约pH 7.3、约pH 6.3至约pH 7.2、约pH 6.3至约pH 7.1、约pH 6.3至约pH 7.0、6.3至约pH 6.9、约pH 6.3至约pH 6.8、约pH 6.3至约pH 6.7、约pH 6.3至约pH 6.6、约pH 6.3至约pH 6.5、约pH 6.4至约pH 7.5、约pH 6.4至约pH 7.4、约pH 6.4至约pH 7.3、约pH 6.4至约pH 7.2、约pH 6.4至约pH 7.1、约pH 6.4至约pH 7.0、6.4至约pH 6.9、约pH 6.4至约pH 6.8、约pH 6.4至约pH 6.7、约pH 6.4至约pH 6.6、约pH 6.4至约pH 6.5、约pH 6.5至约pH 7.5、约pH 6.5至约pH 7.4、约pH 6.5至约pH 7.3、约pH 6.5至约pH 7.2、约pH 6.5至约pH 7.1、约pH 6.5至约pH 7.0、6.6至约pH 6.9、约pH 6.6至约pH 6.8、约pH 6.6至约pH 6.7、约pH 6.6至约pH 6.6、约pH 6.6至约pH 6.5、约pH 6.6至约pH 7.5、约pH 6.6至约pH 7.4、约pH 6.6至约pH 7.3、约pH 6.6至约pH 7.2、约pH 6.6至约pH 7.1、约pH 6.6至约pH 7.0、6.6至约pH 6.9、约pH 6.6至约pH 6.8、约pH 6.6至约pH 6.7、约pH 6.7至约pH 7.5、约pH 6.7至约pH 7.4、约pH 6.7至约pH 7.3、约pH 6.7至约pH 7.2、约pH 6.7至约pH 7.1、约pH 6.7至约pH 7.0、6.7至约pH 6.9、约pH 6.7至约pH 6.8、约pH 6.7至约pH 6.7、约pH 6.7至约pH 6.6、约pH 6.7至约pH 6.5、约pH 6.8至约pH 7.5、约pH 6.8至约pH 7.4、约pH 6.8至约pH 7.3、约pH 6.8至约pH 7.2、约pH 6.8至约pH 7.1、约pH 6.8至约pH 7.0、6.8至约pH 6.9、约pH 6.8至约pH 6.8、约pH 6.8至约pH 6.7、约pH 6.9至约pH 7.5、约pH 6.9至约pH 7.4、约pH 6.9至约pH 7.3、约pH 6.9至约pH 7.2、约pH 6.9至约pH 7.1、约pH 6.9至约pH 7.0、约pH 7.0至约pH 7.5、约pH 7.0至约pH 7.4、约pH 7.0至约pH 7.3、约pH 7.0至约pH 7.2或约pH 7.0至约pH 7.1。

[0292] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的CSP,约0.5至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸,在1×PBS中,pH为约6.4至约7.2。在某些实施方式中,所述稳定rCSP制剂包含1mM的MTG和10%的精氨酸,在1×PBS中,在pH为约6.4至约7.2。在实施方式中,pH为约6.4至7.0。在某些实施方式中,所述pH为约6.7。在实施方式中,所述的rCSP稳定液体制剂存储于约4℃的储存温度下。

[0293] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG,以及约1%至约20%的精氨酸,在0.5X或1×PBS中,在约6.0至约7.5的pH值下。

[0294] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG,以及约10%至约20%的精氨酸,在0.5X或1×PBS中,在约6.4至约7.2的pH值下。

[0295] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG,以及约10%至约20%的精氨酸,在0.5X或1×PBS中,在约6.4至约7.0的pH值下。

[0296] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5或约1至约10mg/ml的rCSP,约0.8至约1.2mM的MTG,约5%至约15%的精氨酸,在1×PBS中,在至约6.4至约7.0的pH值下。

[0297] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含约1至约5mg/ml的rCSP,约1.0mM的MTG,和大约10%的精氨酸,在1×PBS中,在约6.4至约7.0的pH值下。

[0298] 在另外的实施方式中,rCSP稳定液体制剂包含10mM的Tris碱、4.2%甘露糖醇、2%盐酸精氨酸、100 $\mu$ M的EDTA和1mM的MTG,pH为7.5。在实施方式中,稳定的rCSP制剂包含10mM的组氨酸、4.2%甘露糖醇、2%盐酸精氨酸、100 $\mu$ M的EDTA和1mM的MTG,pH为7.0。

[0299] 在实施方式中,所述rCSP稳定液体制剂包含在PBS中的约0.5mM的MTG至约1.5mM的MTG以及约0.3至约0.7M的精氨酸,在约pH 6.4至约pH 7.0下。在实施方式中,rCSP稳定液体制剂包含在PBS中的约1mM的MTG和约0.2至约0.7M的精氨酸,在约pH 6.4至约pH 7.0下。在实施方式中,rCSP稳定液体制剂包含在PBS中的约1mM的谷胱甘肽或1mM的半胱氨酸,以及约1%w/v的精氨酸,在约pH 6.4至约pH 7.0下。在实施方式中,rCSP稳定液体制剂包含在PBS中的约1mM的MTG以及约1%w/v的精氨酸或约0.5M的精氨酸,pH值约为7.0。

[0300] 在进一步的实施方式中,本发明的稳定液体制剂利于使用rCSP制造施用给患者的产品,例如,疫苗。在这方面,需要的是在rCSP制剂中使用的赋形剂满足美国药典委员会(Rockville,MD)的标准,如在美国药典-国家处方集(USP-NF)中所公布的,或美国以外的国家的类似标准,例如,如在国际药典(世界卫生组织)中所公布的。

[0301] 本发明还涉及一种用于在rCSP稳定液体制剂中随着时间稳定地维持rCSP的方法。使用上述相同的稳定性指示剂随着时间评估在rCSP稳定液体制剂中rCSP的稳定维持,例如,稳定维持通过在给定的时间后制剂中存在的%总rCSP正向指示,而通过给定的时间后制剂中存在的%rCSP二聚体、%聚集的rCSP、%变性的rCSP和/或%降解的rCSP负向指示。在实施方式中,百分总rCSP是在给定时间后存在的rCSP(rCSP单体)的百分比。因此,稳定维持可以通过在给定时间后在稳定液体制剂中某种最小量的rCSP的存在指示。在实施方式中,百分总rCSP是在给定时间之后相对于制剂中的rCSP的起始量的制剂中存在的百分rCSP。在其它的实施方式中,百分总rCSP是在给定时间之后存在的百分rCSP。可以通过如本文别处所述的已知方法对rCSP的量进行评估。该%总rCSP等于%rCSP单体,例如,如通过RP-HPLC或SE-HPLC以及在本文的实施例中所确定的。在实施方式中,%总rCSP包含原始rCSP和焦谷氨酸rCSP单体种类。

[0302] 在实施方式中,在rCSP稳定液体制剂中稳定地维持的rCSP是根据本文所描述和多项要求保护的方法制备的,例如,通过用于纯化重组恶性疟原虫环孢子蛋白的方法,所述方法包括:(a)获得包含重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体的细菌细胞裂解物制剂;(b)将步骤(a)的细菌细胞裂解物制剂分离成含有恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体的可溶性部分,和不溶性部分;(c)将步骤(b)的可溶性部分中的重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体与可溶性部分中的宿主细胞蛋白质分离;和(d)使在步骤(c)得到的所述重组恶性疟原虫环孢子蛋白二聚体经历优先还原条件以获得恶性疟原虫环孢子蛋白;以及(e)将在步骤(d)中得到的重组恶性疟原虫环孢子蛋白与宿主细胞蛋白质分离,从而获得纯化的重组恶性疟原虫环孢子蛋白。在实施方式中,步骤(e)的分离包括疏水相互作用色谱。

[0303] 在这些方法中,rCSP在约3°C至约25°C的温度下被稳定地维持至少约7天、至少约8

天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0304] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供或制备rCSP的稳定液体制剂,其中所述rCSP被稳定地维持在约3℃至约25℃的温度下。

[0305] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定的液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供包含在0.5X或1X的PBS中的约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG以及约1%至约20%的精氨酸,在约6.0至约7.5的pH下的制剂,其中所述rCSP在约3℃至约25℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0306] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供包含在1×PBS中的约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸,在约6.4至约7.2的pH值下的制剂,其中所述rCSP在约3℃至约25℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0307] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供包含在1×PBS中的约1至约5、约1至约10、约1至约20、约1至约30、约1至约40或约1至约50mg/ml的rCSP,约0.5至约1.5mM的MTG以及约10%至约20%的精氨酸,在约6.4至约7.0的pH值下的制剂,其中所述rCSP在约3℃至约25℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0308] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供包含约1至约5或约1至约10mg/ml的rCSP,约0.8至约1.2mM的MTG,约5%至约15%的精氨酸,在1×PBS中,在约6.4至约7.0的pH值下的制剂,其中所述rCSP在约3℃至约25℃的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0309] 在实施方式中,本发明涉及一种用于在稳定液体制剂中稳定地维持rCSP的方法,该方法包括提供包含约1至约5mg/ml的rCSP,约1.0mM的MTG和约10%的精氨酸,在1×PBS中,在约6.4至约7.0的pH值下的制剂,其中所述rCSP在约3°C至约25°C的温度下稳定地维持至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天,至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年。

[0310] 在具体的实施方式中,rCSP稳定液体制剂包含约1至约5mg/ml的rCSP,约1.0mM的MTG,以及约10%或0.5M的精氨酸,在1×PBS中,在pH约6.4至约7.0下。在实施方式中,当在2-8°C下存储至少约120小时时,观察到该制剂含有约85至约95%的总rCSP。在实施方式中,当在25°C下存储至少约24小时时,观察到该制剂含有约85%至约95%的总rCSP、约85%至约90%的总rCSP、至少约85%的总rCSP、至少约86%的总rCSP、至少约87%的总rCSP、至少约88%的总rCSP、至少约89%的总rCSP、至少约90%的总rCSP、至少约91%的总rCSP、至少约92%的总rCSP、至少约93%的总rCSP、至少约94%的总rCSP或至少约95%的总rCSP。

#### [0311] 方法

[0312] 在实施方式中,使用荧光假单胞菌发酵全培养液实施纯化方法。在存在解聚剂(disaggregant)的情况下用缓冲液稀释培养液以获得≤20%固形物的均质化进料,例如,在3.1M的尿素,31mM的Tris,pH 8.2中。通过微射流将稀释的发酵液裂解,从而产生细胞裂解物。用2M尿素,20mM的Tris,pH 8.2以1:1稀释裂解物,从而产生10%固形物的裂解物。通过盘栈离心和深度过滤从含rCSP的缓冲液分离裂解物中的荧光假单胞菌固形物。将含rCSP的缓冲液进一步0.2μm过滤并冷冻。在实施方式中,过滤的含rCSP的缓冲液(裂解物)被冷冻在1L或2L的瓶子中,例如,Nalgene<sup>®</sup>PETG瓶。在实施方式中,在-72°C下将所述裂解物冷冻在1L的PETG瓶中至少7小时。在实施方式中,所述裂解物被冷冻至少约7小时到至少约18小时,或落在7小时和18小时之间的约2至约6小时的任何范围。在实施方式中,所述裂解物被冷冻至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约11小时、至少约12小时、至少约13小时、至少约14小时、至少约15小时、至少约16小时或至少约17小时。将rCSP澄清的细胞提取物解冻,然后用阴离子交换色谱(AEX)纯化。在实施方式中,色谱之前将解冻的裂解物保持在室温下。在实施方式中,在解冻后和AEX前对解冻的裂解物进行过滤。在实施方式中,所述过滤是膜过滤。在实施方式中,所述过滤是0.2至0.45μm膜过滤。收集含rCSP的AEX洗脱液并通过羟磷灰石色谱(HA)进一步纯化,并且收集含rCSP的HA洗脱物和存储在2-8°C。使HA洗脱物回至室温并0.2μm过滤,和使rCSP经历优先还原条件。将缓冲液中含有二聚化CSP的色谱洗脱级分汇集到200-600mL的最终体积。通过加入二硫苏糖醇还原剂至20μM的终浓度或MTG还原剂至1mM的终浓度将汇集物进行优先还原,并用磁力搅拌棒和搅拌板在室温下快速搅拌12-24小时。可选择地,将PBS中聚集的rCSP通过在进行优先还原之前首先向材料加入2M尿素进行同样的处理。在实施方式中,rCSP然后通过HIC进一步纯化。

[0313] 在经历优先还原条件之后和/或HIC纯化之后,浓缩rCSP并通过TFF将其渗滤到制剂缓冲液中。

[0314] 可选地,在室温下将HA洗脱物经历优先还原条件,和在渗滤至制剂缓冲液或加载到HIC之前保持过夜,然后浓缩和渗滤。

[0315] 在实施方式中,所述制剂缓冲液包含1mM的MTG和10%的精氨酸。将制剂缓冲液中的渗滤的rCSP通过最终的0.2- $\mu\text{m}$ 的过滤器以得到大批药物物质。

[0316] 纯化的恶性疟原虫环孢子蛋白的分析

[0317] 产品规格

[0318] 用于评估蛋白质的产量和/或质量的许多实验方法是现有技术中已知的。在本文中考虑使用任何适当的方法用于表征重组蛋白。

[0319] 蛋白质产量

[0320] 纯化的rCSP的总体提纯产率或总体过程收率是相对于测定为存在于起始物质中的rCSP量的使用本发明的方法得到的纯化rCSP的总量。它通常表示为百分产率。应该理解,百分产率的测定将不仅依赖于原料(例如,细胞培养物)、细菌细胞裂解物制剂或者可溶性部分(净化前或后)中测得的蛋白质的量,而且也取决于用于每个步骤中的载量。在其中一个步骤(例如,收获步骤)的完全产量并不在下一步骤(例如,细胞破坏步骤)中进行加工的实施方式中,总体过程产率必须使用步骤载量和收率来计算。在使用所有步骤的完全产率时,总体过程产率可以通过将最终产率除以起始材料中的rCSP量来计算。可以使用本领域中已知的或本文所描述的用于测量蛋白质的任何适当的方法,例如,SDS-PAGE,包括SDS-CGE和Western印迹分析。可以在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE。在非还原条件下进行的SDS-PAGE允许单体、二聚体和聚集的种类(HMW聚集体)的单独对比。例如,这种对比可以被用来确定纯化的rCSP单体相对于起始材料中的rCSP单体或相对于起始材料中的rCSP二聚体、单体和聚集种类的产率。在还原条件下的评估给出所有rCSP种类的量度。如本文所描述的和本领域已知的活性测定法,例如,结合测定法,也可以提供关于蛋白质产率的信息。

[0321] 通常,起始量或初始rCSP载量是通过测定在等份细胞培养物、细菌细胞裂解物、可溶性部分或澄清的裂解物部分中的蛋白质浓度而测定的。然后,通过部分数据外推在后续步骤中所处理的材料的量(“载量”)计算出投入到纯化过程中的蛋白质的总量。在实施方式中,初始负载量被用于总体过程产率的测定。在实施方式中,rCSP的起始量包含约1克至约3000克、约100克至约3000克、约250克至约3000克、约500克至约3000克、约750克至约3000克、约1000克至约3000克、约100克至约2000克、约250克至约2000克、约500克至约2000克、约750克至约2000克、约1000克至约2000克、约100克至约1000克、约150克至约1000克、约200克至约1000克、约250克至约1000克、约300克至约1000克、约400克至约1000克、约500克至约1000克或约750克至约1000克。

[0322] 将所得到的纯化的rCSP的总量与原料中测得的rCSP的量相比较以给出作为百分产率(或分数产率)的总体纯化工序产率。在本发明的实施方式中,所获得的纯化rCSP的总体纯化过程百分产率是约10%至约75%。在实施方式中,获得的纯化rCSP的百分产率是至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约30%至约75%、约30%至约70%、约30%至约65%、约30%至约60%、约30%至约65%或约30%至约60%。在实施方式中,这些过程产率是包含有限量的变性、降解、二聚化或聚集的rCSP的rCSP产率。在实施方式中,这些过程产率包含不超过10%的变性rCSP、不超过10%的降解的rCSP、10%的聚集的rCSP和/或10%的二聚化

rCSP。在实施方式中,这些过程产率包含不超过5%的变性rCSP、不超过5%的降解rCSP、5%的聚集rCSP和/或不超过5%的二聚化rCSP。

[0323] 蛋白质产率也可以表示为总细胞蛋白(tcp)的百分比或分数、蛋白质/细胞的量或者干生物质的百分比或比例。在其中根据培养物体积表示产率的实施方式中,可以考虑培养细胞密度,尤其是比较不同培养物之间的产率时。应该了解,也可以测定纯化过程的每个步骤或者多个步骤的回收率(与描述总体纯化产率相反)。

[0324] 蛋白质质量

[0325] 在相关的实施方式中,rCSP针对纯化过程的任何步骤的蛋白质质量进行说明。在如本文中所述的实施方式中,蛋白质的质量可以被描述为二聚化的或非二聚化的、在N-末端降解的或未降解的(或剪切的)或者变性的或没有变性的,即在C-末端区域具有完整的二硫键或它们的任何组合的rCSP的量或百分比的函数。质量的量度还包括例如,通过分析确定为活性的CSP的百分比或分数。在这些实施方式中,活性可以通过将确定为活性的蛋白质的量与所分析的蛋白质总量相比较来表示。在纯化的任何步骤中被确定为,例如,二聚化的、非二聚化的、聚集的、非聚集的、降解的、非降解的、变性的、非变性的、非活性的或活性的蛋白质的量可与在相同的步骤中的蛋白质的总量相比较。例如,所得到的纯化蛋白质中非二聚化的、非聚集的、非降解的、非变性的或活性的rCSP的量可以与获得的纯化rCSP的总量进行比较,以得到非二聚化的、非聚合的、非降解的、非变性的或活性的rCSP等的量的百分比或分数值。可选择地,得到的纯化蛋白质中非二聚化的、非聚集的、非降解的、非变性的或活性的rCSP等的量可以与原料中的非二聚化的、非聚集的、非降解的、非变性的或活性的rCSP等的量相对比,以得到为非二聚化的、非聚集的、非降解的、非变性的或为活性的等的rCSP的回收量的百分比或分数值。

[0326] 如本文所述的或如本领域已知的用于评估rCSP二聚体形成的任何方法可用于测定百分rCSP二聚体形成。该方法可包括,例如,HPLC(包括RP-HPLC和SE-HPLC)。用于评估HMW聚集体形成的方法可包括,例如,HPLC和SDS-PAGE。

[0327] 在本发明的实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约12%的二聚体。在实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约11%、少于约10%、少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的二聚体。在相关的实施方式中,得到的纯化rCSP包含至少88%的单体。在实施方式中,得到的纯化rCSP包含至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少100%的单体。

[0328] 如本文所描述的或如本领域已知的用于评估rCSP降解的任何方法可用于确定百分rCSP降解。方法可包括,例如,LC-MS/完整质量、SDS-PAGE、HPLC(包括RP-HPLC和SE-HPLC)和N-末端测序。

[0329] 在本发明的实施方式中,得到的纯化rCSP包含低于约10%的N-末端降解的总rCSP种类。在实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的N-末端降解的总rCSP种类。在实施方式中,得到的纯化rCSP没有在N-末端降解。在实施方式中,百分降解是在C5/Y6或V14/L15处剪切的百分比。在实施方式中,百分降解是在C5/Y6和V14/L15处都剪切的百分比。在实施方式中,百分降解是在C5/Y6、V14/L15和/或N29/E30处剪切的百分比。在其它实



施方式中,所述百分降解是在C5/Y6、V14/L15、N29/E30和/或S44/L45处剪切的百分比。在实施方式中,百分降解是非特异性降解的所获得rCSP的百分比。在实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约10%、少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的在N-末端非特异性降解的rCSP。在实施方式中,得到的纯化rCSP没有在N-末端非特异性降解。在实施方式中,百分降解是与在N-末端非特异性降解的rCSP的百分比相结合的在C5/Y6、V14/L15、N29/E30和/或S44/L45处剪切的所获得rCSP的百分比。在相关的实施方式中,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或者100%的所得到rCSP在N-末端未降解,或者非特异性地或通过C5/Y6、V14/L15、N29/E30和/或S44/L45处剪切。

[0330] 在本发明的实施方式中,不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或没有所得到的纯化rCSP被降解、剪切或蛋白水解成选自于残基2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的氨基酸(其中残基1是在不包含前导序列的所表达蛋白质中第一个残基,例如,在图2C,SEQ ID NO:3中Q和在图2B,SEQ ID NO:2中的M)。在实施方式中,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的所获得的纯化rCSP对于选自于残基1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、和50的氨基酸是完整的。

[0331] 在具体实施方式中,以约10%至约75%的总体纯化过程产率获得纯化的rCSP,其中所述纯化的rCSP包含少于约5%的二聚体,包含少于约10%的总C5/Y6和V14/L15的剪切种类和少于约5%的变性rCSP。

[0332] 如本文所描述的或如本领域已知的用于评估rCSP变性的任何方法可用于测定百分变性蛋白质。例如,可以使用用于分析二级结构的方法,例如,CD和固有荧光,和用于分析二硫键键合的方法,例如,肽作图和烷基化/完整质量/Glu-C消化。

[0333] 在实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约10%、少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的变性rCSP,例如具有不正确的二硫键键合的rCSP。当在C-末端区域的两个天然二硫键中至少一个错配或不配对时,识别为不正确的二硫键键合。在实施方式中,分别至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的纯化rCSP具有完整的二硫键。在其它实施方式中,变性是通过将纯化rCSP的二级结构的一个或多个量度与参考标准rCSP相比较来测定的。

[0334] 应当理解,用于描述剪切位点或半胱氨酸和二硫键的编号可以根据rCSP氨基酸序列变化。

[0335] 含焦谷氨酸的种类

[0336] 在某些实施方式中,可能希望的是含焦谷氨酸的rCSP种类是有限的,例如,其中谷氨酰胺被脱酰胺为谷氨酸并随后谷氨酸被环化为焦谷氨酸(谷氨酰胺→谷氨酸→焦谷氨酸)的rCSP。如本文所述,已经观察到rCSP的非含焦谷氨酸种类随时间而减少,而含焦谷氨酸种类随时间增加。可以通过在本领域中已知的任何适当的方法,例如,RP-HPLC法,来测量焦谷氨酸。

[0337] 在实施方式中,得到的纯化rCSP包含少于约20%、少于约18%、少于约15%、少于约10%、少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%的含焦谷氨酸的rCSP。

[0338] 在实施方式中,工艺产率包含不超过约20%、18%、15%、10%、5%或1%的含焦谷氨酸的rCSP。

[0339] 在实施方式中,当存储至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约30天、至少约60天、至少约70天、至少约80天、至少约90天、至少约6个月或至少约1年时,rCSP制剂中含焦谷氨酸种类的量增加不大于约0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、6%、7%、8%、9%或10%。在某些实施方式中,当存储约9天到约25天时,含焦谷氨酸种类的最大增加速率是少于或等于约1%至约3%或至约5%。存储前的量(例如,在T=0)可用于对比。

[0340] 在实施方式中,rCSP质量是通过存在少于约10%的rCSP含焦谷氨酸种类指示的。在实施方式中,rCSP质量是由缺少含焦谷氨酸种类指示的,其中这些种类以不超过约10%、不超过约9%、不超过约8%、不超过约7%、不超过约6%、不超过约5%、不超过约4%、不超过约3%、不超过约2%或不超过约1%的总蛋白质或得到的纯化CSP存在。

[0341] 蛋白质纯度

[0342] 在实施方式中,rCSP的纯度是在纯化过程的任何步骤中通过SDS-CGE和/或SDS-PAGE进行评估的,并因此分配纯度值。纯度可以通过SDS-CGE仪软件计算,它将电泳图中靶蛋白(例如,rCSP单体)的峰面积除以其它峰的面积。在实施方式中,使用本发明的方法得到的纯化rCSP的纯度为约85%至100%。在实施方式中,所述纯度为至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、约85%至约99%、约85%至约98%、约85%至约97%、约85%至约96%、约90%至约99%、约90%至约98%、约90%至约97%、约90%至约96%或约90%至约95%。

[0343] 在某些实施方式中,得到的纯化rCSP具有96%的纯度,含有不超过5%的二聚体,不含有可检测的高分子量(HMW)聚集体,含有少于10EU/mg的内毒素,并且没有可检测的蛋白水解剪切。在实施方式中,存在的内毒素不超过约10EU/mg、不超过约25EU/mg、不超过约50EU/mg、不超过约100EU/mg、不超过约250EU/mg、不超过约400EU/mg或不超过约500EU/mg。

[0344] 产物分析

[0345] 在本发明的实施方式中,使用如本文中所描述的、文献中报道的和在本领域已知的方法,在本发明的纯化过程的任何步骤评估所述重组CSP的产率、纯度、质量和稳定性的任一种。本文中提供了用于评估rCSP的测定法作为非限制性实例。

[0346] 测定蛋白质产率

[0347] 本发明提供了一种用于以高的总体纯化产率获得纯化的rCSP的方法。SDS-PAGE方法,例如,SDS-CGE或Western印迹,可以被用来适当地在纯化过程的任何步骤中测定产率和监测rCSP纯度。在实施方式中,包括在产率测量中的蛋白质包括单体rCSP而不包括二聚的或聚集的rCSP。在实施方式中,测定步骤产率和/或总体产率。在实施方式中,使所述rCSP经

历优先还原条件导致由于rCSP二聚体转化成单体而提高的rCSP单体的步骤产率。

[0348] 用于测定产率的合适方法是本领域技术人员已知的,例如,可以通过HTP微芯片SDS毛细管凝胶电泳(SDS-CGE),使用具有HT Protein Express V2芯片和相应的试剂(部件编号分别为760499和760328,Caliper LifeSciences)的LabChip GXII仪器(Caliper LifeSciences,Hopkinton,MA)分析蛋白质样品。样品制备按照生产商的方案(Protein User Guide Document No.450589,Rev.3),并在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。分离后将凝胶染色、脱色和数字成像。

[0349] 可以使用Eppendorf BioPhotometer(Eppendorf,Hamburg,Germany),通过在280nm的吸光度(如通过NTI Invitrogen测定的用于1mg/ml=0.61AU的A<sub>280</sub>)测定纯化rCSP样品的蛋白质浓度。

[0350] 可以根据本领域已知的任何适当的方法,通过将SDS-PAGE凝胶上分离的CSP转移至硝酸纤维素膜并将该膜与单克隆抗-Pf CSP抗体孵育进行Western印迹分析,以测定产率或纯度。

[0351] 可以通过本领域的技术人员已知的合适的方法生成对本文所述的任何分析方法有用的CSP抗体。有用的抗体也已在文献中进行了描述,并且是市售的。已经描述了合适的CSP构象特异性单克隆抗体,例如,Plassmeyer等,2009的对抗体4C2、4B3和1G12进行了表征,并报道其为对CSP变性敏感的。根据在文献中描述的方法可以生成和筛选具有所需结合特性的CSP抗体,例如,由Plassmeyer等,2009描述的。

#### [0352] 测定蛋白质变性

[0353] 在实施方式中,使用本发明的纯化方法来获得未变性的纯化rCSP单体而不需要重折叠。未变性的rCSP具有,例如,可通过比较内部参考标准评估的天然结构。在实施方式中,基于C-末端区域中正确二硫键键合的存在来分析变性。蛋白质的二级或三级结构以及C-末端区域中正确二硫键键合的存在可通过本领域已知的或本文描述的方法进行分析。

[0354] 可以通过使用例如,圆二色性(CD)或固有荧光分析蛋白质的二级结构。CD可以利用分光偏振计(如,Jasco J-815,JASCO)。从185-250nm的远-UV-CD区域监测二级结构的差异(即, $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规卷曲)。可以在Jasco J-815分光偏振计上使用设置为1nm的带宽和扫描速度100nm/min,数字积分时间(DIT)=1秒,用5X积累,采用0.1nm路径长度比色皿,进行远紫外CD光谱(240-190nm)。可以在20°C下在×5mM tris(Sigma,目录号T7818-250G)/16.7mM硫酸钠(Sigma,目录号S9627-500G),pH 7.5缓冲液中对样品进行分析。分析软件,如K2D2,由Perez-Iratxeta等人,2008,“K2D2:estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra,”BMC Structural Biology 8:25(doi:10.1186/1472-6807-8-25),可用于评估蛋白质中的 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 链的百分比。CSP被报道含有5%的 $\alpha$ 螺旋和27%的 $\beta$ 链(通过,例如,Plassmeyer等人,2009)。

[0355] 对于固有荧光,初始分光偏振计温度可设定为20°C,接着逐步增加至40、45、55、65和75°C,随后返回至20°C。在每个温度设置下读取荧光,使得荧光读数可以被设置如下:激发波长280nm;发射波长在295-395nm;灵敏度=790V;数据间距=1nm;数字积分时间(DIT)=1秒;带宽发射=10nm;频谱积累=3;搅拌棒rpm=200。

[0356] 可使用生物层干涉测量法(BLI)来评估得到的rCSP的变性/构象,其测量rCSP与选定靶标的结合。在实施方式中,对与构象特异性抗体(例如,不结合变性蛋白的抗体)和/或

肝素的结合进行测定。功能性结合测定法可用于监测rCSP构象中的差异且可被用作替代效力测定。在本文中和由Plassmeyer, 等人描述了在这些方法中有用的构象特异性抗体的实例。本文在实施例中描述了使用肝素和构象特异性抗体的示例性生物传感器配置。

[0357] 可以用尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 对球状折叠结构进行分析。尺寸排阻基于大小进行分离以比较小的蛋白更早地洗脱较大的蛋白质。在实施方式中, 使用TSK-GEL G3000SWXL柱进行尺寸排阻 (SE) HPLC。值得注意的是, 如实施例中所述, rCSP (其为~38kDa) 具有比预期更短的保留时间。

[0358] 可以如本文在实施例中描述的使用肽作图对二硫键键合进行分析。该rCSP可以经受双重蛋白酶消化, 先用胰蛋白酶, 然后用弹性蛋白酶。通过LC-MS/MS分析双重消化, 并且使用BiopharmaLynx (Waters Corp., Milford, MA) 处理所得的数据以确定两个二硫键键合的二肽。作为阴性对照的过程, 可以通过使用含有与上述 (即, 不正确的) 二硫键C<sub>314</sub>-C<sub>354</sub>和C<sub>318</sub>-C<sub>349</sub>的逆转的方法文件对相同的数据进行处理。

#### [0359] 测定蛋白质降解

[0360] 本发明提供了一种用于获得在N-末端区域中未降解的纯化的rCSP的纯化方法。在实施方式中, 将LC-MS用于监测蛋白水解剪切、脱酰胺化、氧化以及断裂, 并验证该N-末端区域半胱氨酸是未配对的。

[0361] 在实施方式中, 游离的N-末端半胱氨酸是通过烷基化和肽作图进行鉴定, 例如, 如本文在实施例中所述的。

[0362] 在实施方式中, RP-HPLC被用于检测断裂、脱酰胺化和氧化。

[0363] HPLC法可用于表征该rCSP, 从而提供包括单体和二聚体含量的结构信息。在实施方式中, 反相HPLC (RP-HPLC) 用于评估单体和二聚体含量、断裂、脱酰胺化和氧化。添加还原剂, 例如, 20 $\mu$ M的DTT, 可以通过将观察到的二聚体向单体转化和将聚集体转化成二聚体或单体而帮助种类鉴别。用于RP-HPLC的方法, 包括适当的反相 (RP) 柱, 是本领域已知的和被描述在文献中。在某些实施方式中, 使用C<sub>4</sub>Jupiter柱 (Phenomenex)。

[0364] 在实施方式中, 将制备型疏水色谱用于拆分rCSP的单体和二聚体形式。

[0365] 在实施方式中, 使用, 例如, 毛细管等电聚焦 (cIEF) 或成像毛细管等电聚焦 (icIEF) 分析蛋白质电荷异质性。在这些实施方式中, 可以使用标准 (例如, rCSP内部参考标准) 进行对比。如本文在实施例中所述的, 使用cIEF评估的rCSP内部参考标准显示在pI 5.20和pI 5.76的主峰及在pI 4.99、5.08和5.52的较小峰。

[0366] 在实施方式中, 使用肽作图质谱法分析CSP的微不均一性。

#### [0367] 测定蛋白质纯度

[0368] 在实施方式中, 使用本领域中公知的方法对污染物 (包括宿主细胞蛋白质和核酸) 进行评估。

[0369] 如针对产率测定所描述的, SDS-PAGE方法可用于鉴定污染二聚体和高分子量聚集种类。在实施方式中, SE-HPLC被用于识别聚集的种类。

[0370] 在实施方式中, ELISA法被用来测量宿主细胞蛋白质。例如, 可以根据制造商的方案, 使用来自Cygnus Technologies, Inc. 的“Immunoenzymetric Assay for the Measurement of Pseudomonas fluorescens Host Cell Proteins”试剂盒 (目录号F450) 来进行宿主细胞蛋白质 (HCP) ELISA。可以使用Softmax Pro v3.1.2软件在SPECTRAMax

Plus (Molecular Devices) 上阅读板。

[0371] 在实施方式中,通过鲎变形细胞溶解物(LAL)试验来评估内毒素。LAL试验是本领域所熟知的,并已被FDA批准用于测试接触血液的药物、装置和其它产品。在实施方式中,使用Endosafe-PTS便携式内毒素分析仪(Charles River实验室(CHL)),按照制造商提供的操作程序,采用具有1-0.01EU/ml(CHL,部件号PTS2001F)和10-0.1EU/ml(CHL,部件号PTS201F)灵敏度范围的药盒分析洗脱级分中的内毒素量。

[0372] 在实施方式中,使用Q-PCR分析宿主细胞DNA。可以使用,例如,DNA聚合酶I基因特异性的寡核苷酸引物评估宿主细胞DNA。通过实时定量PCR检测表达菌株的表达质粒骨架序列。可以用,例如,DNA Engine Opticon System PTC-200DNA Engine Cycler(MJ Research,CFD-3200Opticon)进行实时PCR。

#### [0373] rCSP内部参考标准的纯化

[0374] 在实施方式中,在与本发明的方法相关地进行的分析中使用rCSP内部参考标准。可以根据在本领域已知的或本文所描述的方法制备参考标准。例如,来自表达rCSP的宿主细胞的细胞糊可被微流化、分离以除去固体细胞碎片和分离以除去宿主细胞蛋白质。最终的纯化rCSP可以通过凝胶过滤被缓冲液交换到PBS(pH 7.2)中,过滤除菌,并存储于-80°C。可以通过,例如,SDS-PAGE分析内部参考标准物的纯度。在实施方式中,通过SDS-PAGE测定rCSP内部参考标准的纯度为>90%。在实施方式中,所述标准物包含少于10%的二聚体。Western印迹分析可以用来确认rCSP的身份和揭示断裂种类的存在。例如,使用对在两个天然二硫键是完整和正确配对的C-末端结构域敏感的抗体,可以对构象特异性抗体进行测定。在文献中,例如,由Plassmeyer,等人,2009,描述了合适的抗体。可对还原的和烷基化的样品分析表明纯化的rCSP标准具有正确的二硫键结构的信号丧失。在实施方式中,rCSP标准的浓度是通过280nm处的吸光度确定的。在实施方式中,参考材料已经证明在动物研究中的效力。

[0375] 在本发明的实施方式中,主要回收过程有两个选择。可以通过离心收获细胞和冷冻细胞糊。细胞糊然后可以解冻和微流化以产生细胞匀浆。可选地,可稀释细胞培养液并直接微流化以产生细胞匀浆而无需保持步骤。

[0376] 在某些实施方式中,使用细胞浆选项。然后使用盘堆式离心机将匀浆澄清,随后是与0.2 $\mu$ m过滤串联的使用X0HC膜的深度过滤。然后将材料保持冷冻作为保持步骤,且随后解冻并加载到TMAE HiCap捕获柱。洗脱的材料通过0.2 $\mu$ m的过滤器,然后直接加载到陶瓷羟磷灰石I型(CHT)柱。然后将CHT柱洗脱液经过0.2 $\mu$ m过滤和轻度还原处理而同时保持在环境温度下。然后将该轻度-还原处理后的材料通过TFF缓冲液交换并0.2 $\mu$ m过滤和冷冻保存于-80°C。

[0377] 在实施方式中,使用本发明的方法获得的纯化rCSP具有如通过SDS-PAGE(SDS-CGE)测定的大于90%的纯度,如通过SE-HPLC测定的少于10%的二聚体,如通过SE-HPLC测定的没有可检测的较高分子量(HMW)聚集物,通过LC/MS可检测的少于5%的片段,和少于100EU/mg的内毒素。虽然在此已经示出和描述了本发明的优选实施方式,但是本领域的技术人员很明显地知道这样的实施方式仅是通过示例的方式提供的。本领域技术人员现在可以想到许多变化、改变和替代而不背离本发明。应当理解的是,对在此描述的本发明实施方式的各种替代方式可在本发明的实施中使用。意在下列权利要求限定本发明的范围,且从

而覆盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

#### [0378] 实例

[0379] 确定并测试为了在本发明的方法中使用的纯化工艺步骤。SDS-CGE分析被用来评估蛋白质的产率和纯度。使用LabChip GXII仪器(Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA)用HT蛋白质表达V2芯片和相应的试剂(部件编号分别为760499和760328, Caliper LifeSciences)通过HTP微芯片SDS毛细管凝胶电泳分析蛋白样品。按照生产商的方案(Protein User Guide Document No.450589, Rev.3)制备样品。

[0380] 使用Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)通过在280nm的处吸光度(对于1mg/ml=0.61AU的 $A_{280}$ ,如通过Vector NTIInvitrogen所测定的)常规测定纯化的rCSP样品的蛋白质的浓度。

[0381] 采用本文所述的方法从被工程化以重组表达CSP的细菌宿主细胞制备在工艺开发和检测开发中使用的细胞浆批。用于制备细胞浆批的荧光假单胞菌菌株所表达的CSP核苷酸序列包含如SEQ ID NO:5所示的优化的核苷酸序列(对应于SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列)。菌株CS533-129是荧光假单胞菌DC469( $\Delta$  pyrF、 $\Delta$  lacI<sup>Q</sup>、 $\Delta$  htpX),其含有编码与LA0分泌前导肽融合的CSP (SEQ ID NO:3)的表达载体。菌株CS533-211是荧光假单胞菌DC488(degP2缺失),其含有编码与CupA2前导肽融合的CSP (SEQ ID NO:3)的表达载体。

#### 实施例

[0382] 实施例1:重组产生的恶性疟原虫环孢子蛋白的优先还原

[0383] rCSP二聚体转化为单体

[0384] 该实施例描述了为了确定用于选择性还原二聚化rCSP的分子间二硫键而同时保持CSP的免疫原性所需的C-末端区域的分子内二硫键和天然结构状态的优先还原条件而进行的实验。

[0385] 如所讨论的,由于可用于形成分子间二硫键的N-末端区域游离半胱氨酸,rCSP在纯化过程中容易二聚化。然后二聚体可根据时间、浓度和温度形成较高分子量的聚集体。重组CSP在其C-末端区域还含有两个二硫键,其被认为是对CSP效力重要的。为了提高单体rCSP的回收率,我们调查了还原分子间的二硫键并将二聚体转化为单体的条件。需要的是不还原C-末端区域分子内二硫键的条件。

[0386] 二硫苏糖醇(DTT)被作为还原剂进行测试并将其加入到1mL的来自不同浓度的丁基650S色谱级分的二聚化rCSP的样品中。在环境温度下将样品在磁力搅拌盘上搅拌过夜。然后通过RP-HPLC分析样品的单体和二聚体含量(图4)。图面A显示了对应于0.5mM(由最低的单体峰和第二高的二聚体峰表示)、0.1mM(与0.03峰重叠的第二高单体峰,第二低二聚体峰)、0.03mM(与0.03峰重叠的第二高的单体峰,最低的二聚体峰)和没有DTT(最高单体峰,最高二聚体峰)的DTT浓度的结果。图面B显示了对应于0.01mM(最高单体峰,最低二聚体峰)、0.003mM(中间单体峰,中间二聚体峰)和没有DTT(最低单体峰,最高二聚体峰)的DTT浓度的结果。

[0387] 分析rCSP时,对于RP-HPLC色谱图常规观察到有三个特征:主要的单体形式的rCSP峰、主rCSP峰之外的拖尾肩峰和迟于主峰1.4分钟洗脱的峰,这是rCSP的二聚体形式。如图4中所示,加入DTT通常降低二聚体的浓度和提高单体峰的浓度;然而,如果DTT的浓度过高

(0.5mM,在图4A中)或过低(0.003mM,图4B中),二聚体向单体的转化率是最小的。用于转化的DTT的最优先还原浓度范围被确定为从0.010至0.030mM的DTT。

[0388] 使用一批含有二聚体和二聚体的HMW聚集体的rCSP(533-128)重复该实验。使用小规模纯化方法在多个循环中产生约3g的批次533-128至>90%的纯度,如通过SDS-PAGE测定的。批次533-128随后被确定为聚集的。加入2M尿素被观察到破坏HMW聚集体,将它们分解为二聚体形式(数据未示出)。将DTT加入至1ml 533-128的样品中,其含有2M尿素与不同浓度的DTT,在pH 7.2和pH 8.0,并在室温下孵育6小时。在环境温度下在磁力搅拌盘上将样品搅拌6h。样品的RP-HPLC分析示于图5中。用于图5A和图B中的实验的DTT浓度分别示于表5和表6中。

[0389] 表5.在pH 7.2下不同DTT浓度下的RP-HPLC

[0390]

完全还原的峰 1 高度 (1-5 最高到最低)	峰 2 高度 (1-5 最高到最低)	DTT 浓度 μM	% 二聚体
1	5	10,000	0.7
4	2	50	13.6
2/3	4	25	10.1
2/3	3	12	9.1
5	1	6	21.2

[0391] 表6.在pH 8.0下不同DTT浓度下的RP-HPLC

[0392]

完全还原峰的 1 高度 (1-5 最高到最低)	峰 2 高度 (1-5 最高到最低)	DTT 浓度 μM	% 二聚体
2	5	10,000	8.8
3	3	50	16.2
1	4	25	10.2
4	2	12	24.4
5	1	6	38.2

[0393] 在pH值7.2下,用于转换的最佳DTT浓度确定为12μM和25μM,以及对于pH值8.0的最佳浓度为25μM。最高浓度的DTT(10mM),对于pH 7.2和pH 8.0的样品都完全降低了二聚体峰,并引起了保留时间向左侧偏移(较短保留时间),这可能是rCSP的完全还原形式。

[0394] 根据所进行的实验,轻度还原方法中所用的最佳DTT浓度被确定为20μM。进行过夜还原步骤(16-18h)对rCSP的质量没有不利的影响,所以此步骤在最终的UF/DF缓冲液交换开始前用作保持点。

[0395] 图6示出了一个实施例,其中用20μm的DTT和混合来处理来自丁基650S色谱(rCSP批次533-241)的~120mg的二聚rCSP 16小时。通过RP-HPLC分析在处理之前的批次中包含

92.1%的二聚体(图6A),和通过TFF的最终缓冲液交换处理后包含94.2%的单体(图6B)。通过SE-HPLC分析最后的缓冲液交换的材料且没有观察到HMW聚集体(图7)。轻度还原方法表现得很稳定,并不受基础缓冲液组合物的小差异的影响。如下所述,从陶瓷羟磷灰石色谱洗脱的重组的CSP二聚体级分也成功地经受轻度还原处理。

[0396] 如本文中详细地描述的,对经过轻度还原处理的rCSP批次通过LC/MS和肽图谱进行分析以证明N-末端半胱氨酸是游离的和C-末端二硫键是完整的。

[0397] 实施例2:用于分析优先还原的重组恶性疟原虫环孢子蛋白的分析方法的开发

[0398] 开发了用于评估重组恶性疟原虫环孢子蛋白的过程中和最终产品分析方法。考虑这些方法用于评估使用实施例1中描述的优先还原条件或者通过任何其它方法获得的rCSP。

[0399] 1.纯化rCSP内部参考标准

[0400] 如下对用作为内部参考的rCSP(批次533-191)进行纯化。

[0401] 用于纯化的裂解物的制备

[0402] 将来自培养的CS533-129细胞的冷冻的细胞糊(~70g)解冻并再悬浮在无蛋白酶抑制剂的20mM的Tris,pH 8.0缓冲液(使用1M TRIS设备制备的Milli-Q水稀释50倍的1摩尔原液,pH 8.0,产品目录号T1080,Teknova,Hollister,CA)中,和通过经过Microfluidics Microfluidizer M-110Y以15,000psi均质化一次。将裂解物以12,000g离心60分钟,并经过Sartorius Sartobran P 0.45/0.2 $\mu$ m过滤器室(目录号5235307H8-0-A,Sartorius-Stedim,Bohemia,NY)过滤。用8.0M的尿素原液(目录号4203-08,JT Baker,Phillipsburg,NJ)将过滤的裂解物调节至2.0M的尿素。

[0403] 色谱

[0404] 使用配备Frac-950级分收集器的ÄKTAexplorer100色谱系统(GE Healthcare)进行快速蛋白质液相色谱(FPLC)操作。在下表7中总结了30mg的纯化CSP的制备中所用的用于纯化运行的条件。使用的材料:Q-Sepharose FF(目录号17-0510-01,GE Healthcare,Piscataway,NJ);AK26/20柱(部件号28-9889-48,GE Healthcare);丁基-650S(目录号14701,TosohUSA,Flemington,NJ);氯化钠(目录号13423,Sigma/Riedel de Haen,St.Louis,MO);氢氧化钠(目录号5674-03,JT Baker,Phillipsburg,NJ);硫酸铵(目录号BDH9001,VWR,West Chester,PA);和尿素(目录号4203-08,JT Baker,Phillipsburg,NJ)。

[0405] 表7.纯化运行条件



[0406]

柱	柱尺寸	保留时间	运行条件
捕获步骤 Q Sepharose FF	2.6 cm 直径×12.7 cm 高度  体积: 67 mL	5.1 min	平衡缓冲液(EQ): 20 mM Tris, 2.0 M 尿素, pH 8.0 载量: 过滤的裂解物, 调节至 2.0 M 尿素 洗涤: 3 CV EQ 缓冲液 洗脱: 线性梯度洗脱, 15 CV 的 0-40% B1 (20 mM Tris, 1.0 M NaCl, 2.0 M 尿素, pH 8.0), 和用 100% B1 的 3 CV 分

[0407]

			步洗脱 洗提: 3 CV 0.5 N NaOH
最终精制 丁基-650S	2.6 cm 直径×11.1 cm 高度  体积: 59 mL	4.0 min	平衡缓冲液(EQ): 20 mM Tris, 2.0 M 尿素, 1.0 M 硫酸氨, pH 8.0 载量: Q-FF 洗脱池, 用加入颗粒状硫酸铵至 1.0 M 洗涤: 5 CV EQ 缓冲液 洗脱: 线性梯度洗脱, 20 CV 的 0-100% B1 (20 mM Tris, 2.0 M 尿素, pH 8.0), 和用 100% B1 的 2 CV 分步洗脱 洗提: 3 CV 0.5 N NaOH

[0408] rCSP二聚体转化为单体

[0409] 将在缓冲液[洗脱缓冲液: 2M尿素, 200-600mM的硫酸铵和20mM Tris, pH 8.0]中含二聚化CSP的疏水相互作用色谱洗脱级分合并到200-600ml的最终体积。合并物通过添加二硫苏糖醇还原剂(JT Baker, , 部件编号JT-F780-2, Phillipsburg, NJ) 至终浓度20 $\mu$ M并用磁力搅拌棒和搅拌盘在室温下快速搅拌12-24小时进行选择还原。可选择地, 通过在进行选择还原之前首先向材料加入2M尿素将PBS中的聚集rCSP(例如, 批次533-128) 进行同样的处理。

[0410] 最后的缓冲液交换

[0411] 通过脱盐色谱法(PD-10柱, 目录号17-0851-01, GE Healthcare) 将轻度还原的rCSP池交换到1 $\times$ PBS缓冲液中。对于较大的制剂, 用1 $\times$ PBS(Teknova, P0191, 20倍浓缩物) 通过切向流过滤将优先还原的rCSP池渗滤。在缓冲液交换过程中用Pellicon XL(10kDa, 50cm<sup>2</sup>) 和Pellicon 2(5kDa, 0.1平方米和10kDa, 50平方厘米和0.1平方米) 再生的纤维素膜(EMD Millipore, Billerica, MA) 保留CSP。用FilterTec和SciPres(Scilog, Inc., Madison, WI) 装置来收集跨膜压力(TMP) 和来自平衡的渗透量数据。FilterTec或Masterflex L/S(Cole Parmer, Vernon Hills, IL) 蠕动泵被用于渗余物再循环。聚丙烯和PETG容器被用作混合和再循环容器。Tygon(Cole Parmer) 和铂固化硅树脂(Cole Parmer; AdvantaPure,

Southampton, PA) 管被用来引导流体流。用 Millipak Durapore® (EMD Millipore) 或 Sartobran® P (Aubagne, France) 灭菌 0.22 μm 膜过滤负载 (轻度还原的 CSP) 和渗余物 (渗滤的负载)。

[0412] 在产物引入之前将膜用 1 × PBS 平衡。在室温 (21–23 °C) 下, 以 324 升每平方米每小时 (LMH) 和 648 LMH 将优先还原的 CSP 跨膜再循环。在 10 kDa 和 5 kDa 的膜上时分别将 10–15 psi 和 21–24 psi 的 TMP 施加至渗余物。对于 6 倍渗余物体积 (渗滤体积) 进行恒定体积渗滤。质荷比 (靶标 ÷ 膜面积) 为 2.6–14.6 g/m<sup>2</sup>。在一个实验中, 经过 3 渗滤体积, 渗余物被浓缩 2 倍和渗滤另外三个渗滤体积。用磁力搅拌棒和搅拌盘混合渗余物。膜通过在室温再循环 0.1 N 的 NaOH ≥ 60 分钟清洁。通过标准化水渗透性测量来验证膜的再生。

[0413] 如建立的方法和在下方的多个部分所讨论的, 对这种材料的各种重新处理的批次进行了分析。

[0414] 2. HPLC

[0415] 反相 HPLC (RP-HPLC)

[0416] 开发反相 HPLC (RP-HPLC) 方法来评估 rCSP 单体和二聚体含量、断裂、脱酰胺化和氧化。

[0417] 在配备有自动进样器、四元泵和多波长 (紫外-可见) 的检测模块的 Agilent 1100 系列液相色谱系统 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) 上进行分离。流动相试剂为分析纯或可得的最佳的。所用乙腈为色谱级 (J.T. Baker, 'Baker Analyzed'® HPLC 溶剂, ≥ 99.9%, 目录号 9017-33)。TFA (三氟乙酸) 获自 Pierce (目录号 28904)。使用 Milli-Q 系统 (Millipore, Bedford, MA) 获得去离子水并在使用前用 PES 过滤单元, 1000 ml, 90 mm, 0.2 μm 过滤除菌装置 (Nalgene, 目录号 567-0020) 过滤。流动相 A 含有水中的 0.1% TFA (体积/体积); 溶剂 B 含有乙腈中 0.1% 的 TFA (体积/体积)。用 PBS, pH 7.2 (目录号 14200, GIBCO, Carlsbad, CA) 稀释样品并将 30–60 μl 注射到配备保护盒 (Security Guard, 4 × 3 mm, 目录号 KJ0-4282) 的 Jupiter C<sub>4</sub> (Phenomenex, 部件 No. 00G-4167-E0) 柱 (300 Å 孔, 5 μm 颗粒大小, 4.6 × 250 mm) 上。梯度条件为 22%–32% 流动 B, 20 分钟。柱温为 50 °C。流速为 1 ml/分钟。检测为 214 nm 和 280 nm。

[0418] 图 8 所示的是用于测定 rCSP 的二聚体和单体形式的过程中样品分析。通过还原和非还原 SDS-CGE 分析测定制备型疏水色谱拆分的 rCSP 单体和二聚体形式 (图 8A–C)。通过 RP-HPLC 对分离的形式的分析显示具有不同的保留时间的单一峰, 其与上述单体和二聚体的混合物的保留时间一致 (图 8D)。

[0419] 尺寸排阻 HPLC (SE-HPLC)

[0420] 开发 SE-HPLC 方法以鉴定聚集的种类和分析 rCSP 的球状结构。

[0421] 在 TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>, 7.8 mm ID × 300 mm, 5 微米 (Tosoh, 目录号 8541) 上用配备于 Agilent 1100 系列液相色谱系统 (Agilent Technologies, Inc.) 的 Guard TSKgel SW<sub>XL</sub> (Tosoh, 目录号 8543) 进行尺寸排阻色谱。流动相为磷酸盐缓冲盐水 (PBS), pH 7.4, 用 MilliQ 水从 10X (Mediatech, 目录号 46-013-CM) 稀释, 并在使用前用 PES 过滤单元, 1000 ml, 90 mm, 0.2 μm 过滤除菌装置 (Nalgene, 目录号 567-0020) 过滤。流速为 0.5 ml/min<sup>-1</sup>; 注射体积为 50–100 μl; 和在 280 nm 处监测吸光度。

[0422] 图9A示出rCSP (533-191)的SE色谱图,其中使用提供了最好性能的TSK-GEL G3000SWXL柱。尺寸排阻基于大小分离蛋白质,使得较大的蛋白质洗脱早于较小的蛋白质。根据rCSP的分子量(~38kDa),保留时间应比所观察到的更长。例如,在同一柱上色谱分析校准标准品如BSA,其具有~67kDa的分子量(尺寸比rCSP大~1.8×),以比rCSP晚1.66分钟的保留时间洗脱,图11B。对于这一点的一种解释是CSP的高度伸展的非球形结构,它可能对于通过SE-HPLC的尺寸分级误导。通过与SE-HPLC偶联的多角度激光散射(MALS)检测测定rCSP的分子量,并测定为42-46kDa,这接近其实际分子量(未示出)。通过MALS测量的BSA大小为70.5kDa,这也接近其分子量。

[0423] 通过SE-HPLC连同通过其他方法确定为质量受损的样品分析rCSP的受迫降解研究。如图10中所示对rCSP的聚集形式进行分析。图10A示出了使用离心浓缩装置浓缩的样品,在rCSP的情况下,产生二聚体和高分子量(HMW)聚集体。图10B示出被认为是高度聚集的rCSP批次533-128的SE-HPLC分析。

#### [0424] 3. SDS-PAGE

[0425] 开发了SDS-PAGE法以分析rCSP纯度和降解片段。用Laemmli样品缓冲液(Bio-Rad,目录号161-0737)1:1稀释样品,并随后在热循环仪中在95℃加热5分钟。使样品达到室温,然后加载到18-孔Bio-Rad的10%Bis-Tris凝胶(Bio Rad,目录号345-0112),并在100V下进行电泳20分钟,随后是200V进行60分钟,在1X MOPS运行缓冲液(Bio-Rad,目录号161-0788)中。在PAGE分离过程中将运行缓冲液冷却到10℃。分离后,用GelCode蓝染料(Pierce,目录号24592)染色凝胶,脱色,并用数字成像仪成像。

#### [0426] 4. Western印迹

[0427] 开发了蛋白质印迹法以监测rCSP纯度降解片段。

[0428] 使用1X的NuPAGE转移缓冲液(Invitrogen,目录号NP0006-1),用20%甲醇将蛋白质从SDS-PAGE凝胶在100V下60分钟转移到0.2μm的硝酸纤维素膜(Bio Rad,目录号1620232)。有些样品在SDS-PAGE前进行烷基化。对于该分析,加入相对于还原的样品过量的碘乙酰胺(Sigma,p/n I6125)至5mM的终浓度,并在室温下在黑暗中孵育30分钟。将膜在室温下在PBS(Pierce,37528)中的Blocker™酪蛋白中封闭1小时。对于检测,将稀释剂倒出并再加入含有1:2000稀释的单克隆抗PfCSP的更多稀释剂。将印迹在4℃下摇动孵育过夜。用PBS-Tween将印迹洗涤三次,每次5分钟,并然后在含有1:5000稀释的源自山羊的抗小鼠IgG(γ链特异的)-过氧化物酶(Southern Biotech,1030-05)的更多稀释剂中孵育,在室温下1小时。将印迹用PBS-Tween(Sigma,P3563)洗涤三次,每次5分钟,然后使用免疫纯金属增强的(Immunopure Metal Enhanced)DAB底物(Pierce,34065)在室温下显色1分钟。用AlphaInnotech FluorImager进行成像。

#### [0429] 5. 生物层干涉(BLI)

[0430] 使用生物层干涉测量法(BLI)作为检测方法开发用于rCSP的结合测定法。可以使用BLI来监测折叠和rCSP结合于构象特异性抗体和/或肝素的能力的功能性。因此,功能性结合测定法可用于检测rCSP构象中的差异和可被用作活性测定。建立了三种策略:一种涉及肝素,其中CSP结合肝素作为其功能的部分以结合于肝细胞硫酸肝素蛋白聚糖,和另外两种策略涉及构象特异性单克隆抗体。

[0431] 方法:使用在ForteBio(Menlo Park,CA) Technical Note:“Biotinylation of

Protein for Immobilization onto Streptavidin Sensors”中所描述的方法,采用针对抗体的2.5:1摩尔比的NHS-LC-LC-生物素(Pierce,目录号21343)生物素化单克隆抗CSP抗体IG12或4C2(由Plassmeyer,等人,2009描述,上面提到的,其也描述了用于分离识别CSP的抗体的方法)。如上所述生物素化肝素,来自Calbiochem(目录号375095,Calbiochem是EMD Chemicals,Gibbstown,NJ的一个部门)。在1×动力学缓冲液(10×动力学缓冲液,ForteBio,目录号18-5032,10倍稀释至PBS中)中水合生物传感器(Streptavidin Biosensors,ForteBio,目录号18-0009)至少10分钟。传感器加载有10μg/ml的生物素化的底物,其稀释到样品稀释剂(ForteBio,目录号18-5028)中,在Sidekick™(ForteBio)振荡器/混合器上在室温和1000rpm下90分钟或不经混合在4℃过夜。

[0432] 将样品稀释成样品稀释剂或1×动力缓冲液中。以100μl体积将样品和标准物加载到半面积板(E&K Scientific,目录号EK-78076)中或将200μl加载到标准尺寸的96孔板(E&K Scientific,目录号EK-25209)中。

[0433] 将传感器在1×动力缓冲液中浸泡约5分钟,并然后在接近受试样品总蛋白质浓度的空可溶性部分的稀释液中在Sidekick振荡器/混合器上以1000rpm预平衡40分钟。在开始测定之前,将样品板在30℃下在Octet BLI仪中预平衡10分钟。在1000rpm,30℃下读取样品180秒,并从64、32、16、8、4、2、1和0.5μg/ml的底物标准曲线计算定量。

[0434] 结果:如图11A所示是使用肝素用于rCSP结合的生物传感器配置。对于肝素结合测定三种rCSP制剂,其各从表达SEQ ID NO:3所示的rCSP的细胞制备:批次533-036;批次533-191,其纯化作为内部参照标准;和批次533-128。如图11B所示是在不同浓度下用于这些制剂的结合率的结果。各个样品浓度的速率彼此有很大不同(图11B和C)。

[0435] 6.毛细管等电聚焦(cIEF)

[0436] 开发了毛细管等电聚焦电泳分析方法来监测rCSP电荷异质性。

[0437] 样品制备:通过在2M尿素(JT Baker,目录号4203-08)和10mM DTT中孵育2小时还原样品,并然后用10kDa的Millipore Microcon离心浓缩机(目录号42407)浓缩至>1.5mg/mL。然后将30微升样品与5μl的40%Pharmalytes pH 2.5-5(GE Healthcare,目录号17-0451-01),5μl的40%Pharmalytes pH 5-8(GE Healthcare,目录号17-0453-01),35μl的1%甲基纤维素(ProteinSimple,目录号101876),25μl的8M尿素和pI标志物4.22和6.14(ProteinSimple,目录号分别为102350和102220)混合。

[0438] 方法:在iCE280分析仪(Convergent Bioscience,Toronto,Canada,S/N 1348)上进行采集和分析,其配备CFR软件2.3.6版,cIEF盒-FC涂层(Convergent Bioscience,目录号101700)和PrinCE MicroInjector(Convergent Bioscience,S/N 54-20-07-4-048)。使用下面的分析仪设置:聚焦周期1=1500V进行1.0分钟;聚焦周期2=3000V进行7.0分钟;样品传输时间=135秒;洗涤持续时间=0秒;扫描平均=16;曝光时间=73毫秒;脱盐电流=101μAMP;传输时间延迟=0.0分钟;检测=280nm。

[0439] 通过iCE软件进行pI标志物的校准,然后通过ChromPerfect5.5.6版进行数据的转换和处理。电解槽试剂包含0.1%的甲基纤维素中的0.08%磷酸,和在0.1%甲基纤维素中的0.1M氢氧化钠(两种试剂为SimpleProtein试剂盒的部分,部件号102506)。

[0440] 使用CIEF建立分析rCSP的电荷异质性的方法且结果示于图12中。内部参考rCSP批次533-191显示在pI 5.20和pI 5.76的主峰及在pI 4.99、5.08和5.52的较小峰(图12A)。基

于初级氨基酸序列所计算的等电点为pI 5.21。较低的pI峰很可能是由于rCSP中天冬酰胺残基的脱酰胺化,其产生负电荷和降低pI。

#### [0441] 7. 圆二色性和固有荧光

[0442] 开发用于rCSP的圆二色性(CD)方法。185-250nm的远UV-CD区域监测二级结构差异(即, $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ -折叠和无规卷曲)。评估固有荧光用于监测三级结构差异。

[0443] 方法:在Jasco J-815分光偏振计(JASCO)上进行远-UV CD光谱(240-190nm),带宽设定为1nm和扫描速度为100nm/分钟,数字积分时间(DIT)=1秒,5 $\times$ 积累,采用0.1mm路径长度小池。在20 $^{\circ}$ C下在 $\times$ 5mm tris(Sigma,目录号T7818-250G)/16.7mM硫酸钠(Sigma,目录编号S9627-500G),pH 7.5缓冲液中分析样品。

[0444] 结果:图13A示出了对于在磷酸盐缓冲盐水中0.37mg/ml的rCSP参考材料的CD线谱。该CD谱表现出在200nm最低,没有其他区别的最小值或最大值。这些特征表明 $\alpha$ -螺旋的低百分比。使用K2D2软件进行分析,从而产生图16B的8%的 $\alpha$ 螺旋和29%的 $\beta$ 链的结果。最大误差为0.23。这些数值与文献中所报道的那些一致(5%的 $\alpha$ 螺旋和27%的 $\beta$ 链,例如,在Plassmeyer, ML等,2009年,Structure of the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein, a Leading Malaria Vaccine Candidate, JBC 284 (39): 26951-26963中)。

[0445] 对于参考标准533-191测定rCSP的荧光光谱。用于分析的初始温度设置为20 $^{\circ}$ C,接着逐步增加至40和75 $^{\circ}$ C,随后返回至20 $^{\circ}$ C。在各温度设置下读取荧光光谱。发射最大值为340nm,并且随着温度的升高没有显著偏移。然而,基线确实增加,其原因尚不清楚。变性时在最大值处的发射强度在75 $^{\circ}$ C下显著降低。在返回到20 $^{\circ}$ C时,发射强度恢复到比初始读数更高的水平;这可能是由于基线的向上偏移。

#### [0446] 8. 质谱分析

##### [0447] 通过LC-MS的完整质量分析

[0448] 方法:对制剂533-191进行完整质量分析。完整质量分析可用于监测蛋白水解剪切(例如,在N-末端处)、脱酰胺化、氧化和断裂。通过LC-MS在非还原和还原条件下对样品进行分析。

[0449] 结果:对于还原分析,纯化的533样本与等体积的UTD缓冲液(7.2M尿素,100mM Tris pH 7,100mM DTT)混合。然后在分析之前将还原的样品在37 $^{\circ}$ C下加热30分钟。对于非还原的分析,将样品纯净地运行。对于烷基化的样品,参阅下文。对样品(10 $\mu$ g)进行LC-MS分析,其使用互连的自动进样器、柱加热器、紫外检测器和用电喷雾接口与Q-ToF微质谱仪(Waters)偶联的HPLC(Agilent 1100)。运行前,用NaCsI从600-2600m/z校准质谱仪。将配有保护柱(Zorbax 5 $\mu$ m,300SB-CN,4.6 $\times$ 12.5mm,Agilent,P/N 820950-923)的CN柱(Zorbax 5 $\mu$ m,300SB-CN,2.1 $\times$ 150mm,Agilent,P/N 883750-905)用于在50 $^{\circ}$ C下分离。所用的HPLC缓冲液为缓冲液A(0.1%甲酸)和缓冲液B(90%乙腈0.1%甲酸)。在开发的新方法中,在以5%B注射样品后,柱立即用17分钟从5%至30%B的梯度建立,并然后升至100%B持续5分钟,以5%B保持5分钟结束。流速为0.3ml/min,和前10分钟使用MS切换阀将流转向废料以使得样品脱盐。533靶蛋白(CSP)在 $\sim$ 17.9分钟洗脱。

[0450] 在MS之前,从180-500nm采集UV吸光度。在正模式中2.5千伏下使用ESI-MS源。使用600-2600m/z范围以每秒2次扫描进行MS扫描。使用MassLynx软件(Waters)对MS和UV数据进

行分析。生成UV色谱图和MS总离子流(TIC)色谱图。目标峰的MS谱相加。总和质谱使用MaxEnt 1(Waters)扫描对于10,000–80,000的分子量范围去卷积,使用每通道1Da的分辨率和0.25Da的Gaussian宽度。对于还原的和非还原的,完全处理的533的理论分子量分别测定为38,725.0Da和38,721.0Da。

[0451] 对于还原的和非还原的样品,所观察到的和理论分子量之间的差异( $\Delta MW$ )分别是1和4Da。对于使用具有5,000的分辨率的仪器对这样大小的蛋白质进行的分析,这是在4Da  $\pm$  4Da的预期质量精度范围内。由于仪器的质量精度限制,不可能仅通过完整质量分析来测定二硫键形成的状态。这一分析的结果示于图14中。

[0452] 完整质量分析之后的半胱氨酸烷基化

[0453] 为了研究二硫键形成的状态,对制剂533-191进行半胱氨酸烷基化实验。

[0454] 方法:对纯化的533-191样品进行烷基化用于分析原始蛋白质中的游离半胱氨酸。对于这种分析,向原始非还原533样品中加入碘乙酰胺(Sigma,P/N I6125)至5mM的终浓度,并于室温下在黑暗中孵育30分钟。随后将反应物脱盐到PBS中进行完整质量分析,或者至25mM的 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 中用于采用尺寸排阻旋转柱(0.7ml,Pierce,P/N89849)进行消化。

[0455] 在变性和所有二硫键完全还原之后,将纯化的533-191样品也进行所有半胱氨酸的烷基化。对于变性的和还原的样品的烷基化,加入尿素到2M的终浓度,加入DTT至10mM的终浓度,和将样品在37°C下孵育30分钟。接着,加入碘乙酰胺到30mM的终浓度,并在室温下在黑暗中孵育30分钟。然后如上所述将样品脱盐用于完整质量分析或消化。

[0456] 结果:如上所述,将碘乙酰胺加入到非还原的和还原的样品。通过LC-MS将这些样品进行完整质量分析,其结果如图15所示。对于非还原的和烷基化的样品,观察到的质量与含一个半胱氨酸烷基化的533-191是一致的(图15A)。假定N-末端半胱氨酸被烷基化,尽管本实验中没有确定哪一个半胱氨酸实际上被烷基化。对还原的和烷基化的样品的分析表明,在533-191被完全还原时所有5个半胱氨酸被烷基化(图15B)。

[0457] 观察到烷基化的非还原的533-191与具有一个半胱氨酸烷基化的533的理论分子量相比有6.0Da的差异。观察到还原的和烷基化的533-191与具有五个半胱氨酸烷基化的533的理论分子量相比有3.9Da的差异。存在与含4个半胱氨酸烷基化的533相关的另外的种类,并且以 $\sim$ 43%的总丰度存在。该观察最有可能是由于不完全烷基化。

[0458] 通过烷基化和肽图谱识别游离的N-末端半胱氨酸

[0459] 开发了肽作图分析方法来评估rCSP微观不均一并确定在rCSP的N-末端区域的可用半胱氨酸。

[0460] 方法:如上所述将原始的非还原的烷基化的和还原的烷基化的533样品脱盐到25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 。对于单个消化,用不同的蛋白酶消化5–20 $\mu\text{g}$ 的脱盐样品。对于胰蛋白酶(Sigma,蛋白质组学级,P/N T6567)和Glu-C(Roche,测序级,P/N 11420399001)消化,各蛋白酶以1:50(重量:重量)酶:底物加入,并在37°C下孵育过夜。也进行胰蛋白酶和弹性蛋白酶的双重消化。首先,将样品如上用胰蛋白酶消化。胰蛋白酶消化后,以不同的比例,1:20、1:100和1:500加入弹性蛋白酶(Sigma,IV型,P/N E0258),和在37°C下孵育7小时。所有上述消化利用加入甲酸至1–5%(体积:体积)的终浓度停止。

[0461] 如下所述对每个消化物的2 $\mu\text{g}$ 进行LC-MS/MS分析。运行前,用NaCsI从200–2000m/z校准质谱仪。上述LC-MS设置被用于消化物的分析,不同的是使用 $\text{C}_{18}$ 柱(Zorbax 300SB  $\text{C}_{18}$ ,

2.1×250mm, 5 $\mu$ m, Agilent, 部件号881750-902)用于分离。用下列LC片段建立柱:10分钟的5%B, 5-40%B的梯度, 50分钟, 40-60%B的梯度, 20分钟, 100%B, 5分钟和5%B, 5分钟;在0.3ml/min和50°C运行。在MS之前从180-500nm采集UV吸光度。在2.5千伏下在正模式中使用MS离子源。使用MS/MS扫描策略, 它包括监察MS扫描, 之后是与数据无关的MS/MS扫描。使用100-2000m/z范围和0.5秒的扫描时间进行扫描;以6V的碰撞能量进行监察扫描和以28V进行与数据无关的MS/MS扫描。获得后, 每个原始文件使用在特定的保留时间处的先前观察的某些肽进行锁定质量校准。

[0462] 使用BiopharmaLynx (Waters) 来分析LC-MS/MS结果。对于单个胰蛋白酶Asp-N和Glu-C消化物, 使用以下参数:60ppm的质量公差, 允许2个错失-切割, 和半特异性(使肽的一端为非特异性的);允许Asp-N和Glu-C在天冬氨酸和谷氨酸处被切割(就特异性而言)。对于测定序列覆盖, 使用2%的强度过滤器(即, 为计数作为识别, 肽离子必须大于2%的最强烈的鉴定的肽离子的强度);此外, 研究在N和Q的脱酰胺化的可变性。对于非还原的消化物, 将533的预期的二硫键(C<sub>314</sub>-C<sub>349</sub>和C<sub>318</sub>-C<sub>354</sub>)用于单体制剂的研究;及对于寻找二聚化的情况, 加入两个拷贝的533序列, 使用上述的二硫键, 加上C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>分子间二硫键加入到该方法文件。用于还原的和烷基化的消化物, 使用在半胱氨酸的固定修饰(脲甲基-半胱氨酸)进行研究, 而无需在蛋白质序列中的任何二硫键。对于非还原的和烷基化的样品, 使用在半胱氨酸处的可变烷基化进行研究而无需在蛋白质序列中的任何二硫键。对于双消化(胰蛋白酶和弹性蛋白酶)样品, 100ppm和没有酶特异性被用于研究。带有两个二硫键的整个蛋白质序列的非特异性研究将花费额外的时间量来完成, 使其不实用。因此, 使用含有组成两个二硫键的4个半胱氨酸的533序列的仅仅三个短的片段。这些序列由氨基酸303-325、348-350和354-362组成, 并且是构成胰蛋白酶的二硫键键合的三肽的肽序列。这些序列作为分离的蛋白质序列加入方法文件中, 和使用上面提到的正确的二硫键。

[0463] 结果:实施肽作图以确定哪些半胱氨酸在上述烷基化的非还原的533-191样品中被烷基化。Glu-C是所用的蛋白酶, 因为产生的大小大致近-N-末端肽(E2)的大小。此肽含有第一半胱氨酸(C<sub>5</sub>), 预期的游离半胱氨酸。将消化的样品进行LC-MS/MS分析。如在方法部分中所述的, 使用BiopharmaLynx软件鉴定烷基化的E2肽(图16A)。此肽是所确定的最强肽之一, 和具有确定的22b-和y-离子(数据未示出)。Glu-C消化还可以产生另外两个非常明显的肽, E18含有第二和第三半胱氨酸(C<sub>314</sub>和C<sub>318</sub>), 和E23含有第五半胱氨酸(C<sub>354</sub>)。可以在完全还原的和烷基化的样品中以高强度观察到这两个肽(数据未示出)。然而, 这些肽没有以在前述非还原的烷基化样品533-191的分析中的显著水平鉴定。这表明, 这些肽中的半胱氨酸主要涉及二硫键。最后, 我们试图确定在同一样品中的C<sub>5</sub>和C<sub>5</sub>之间的分子间二硫键。BiopharmaLynx用于研究同样的数据, 但允许533的两个拷贝之间通过C<sub>1</sub>的二硫键。在该研究中确定该二硫键键合的二肽, E1-E2:E1-E2, 图16B。E1-E2表示在肽内谷氨酸残基处的缺失的切割。在这种情况下, 缺失的切割可能是由于相邻的二硫键所引起的蛋白酶接近受限。这是低强度的离子, 与在其中该制剂中的二聚体与单体相比是次要组分的数据(例如, RP-HPLC, SE-HPLC)一致。总之, 非还原的、烷基化的533-191的Glu-C分析提示, 近-N-末端半胱氨酸(C<sub>5</sub>)是唯一游离的半胱氨酸, 和这是533-191的主要形式。因此, 该选择性还原方法似乎只还原C<sub>5</sub>-C<sub>5</sub>分子间二硫键而不是分子内二硫键。

[0464] 通过肽作图的二硫键分析

[0465] 通过肽作图对Pfenex产生的533中的二硫键的性质进行分析。对533-128进行顺序的双重消化,先用胰蛋白酶,然后用弹性蛋白酶。以三个不同的酶:底物比率对弹性蛋白酶消化进行测试。通过LC-MS/MS分析所有双重消化物,并且使用BiopharmaLynx处理所得的数据。首先预期的二硫键(C<sub>314</sub>-C<sub>349</sub>和C<sub>318</sub>-C<sub>354</sub>)被包括在研究参数中。其结果是,在所有三个双重消化中确定多个二硫键键合的二肽。表8中示出了构成两个二硫键的这些二肽中的两个。作为阴性对照过程,相同的数据也使用含有与上述相反(或不正确)的二硫键C<sub>314</sub>-C<sub>354</sub>和C<sub>318</sub>-C<sub>349</sub>反转的方法文件处理。从该研究中,识别一些二硫键键合的二肽。然而,与使用正确的二硫键的先前的研究(数据未示出)相比,这些识别在发现的离子强度、 $\delta$ 质量和b/y片段离子方面具有显著较差质量。总之,来自双重消化的数据表明,主要形式的或者可能是唯一形式的533-128包含预期的二硫键C<sub>314</sub>-C<sub>349</sub>和C<sub>318</sub>-C<sub>354</sub>。

[0466] 表8. 通过肽作图的二硫键分析

[0467]

二硫键	二肽	$\Delta$ 质量 (ppm)	发现的 b/y 离子
C2-C4	IQNSLSTEWSPCS (SEQ ID NO: 26)=ICK	28.9	8
C3-C5	TCGNGIQVR (SEQ ID NO: 27)=CSSV (SEQ ID NO: 28)	22.3	9

[0468] 全氨基酸序列覆盖

[0469] 对于通过肽作图的全氨基酸序列覆盖,在还原的和烷基化的样品(533-128)上测试多个蛋白酶。对每个消化物进行LC-MS/MS和通过BiopharmaLynx进行分析。组合来自Asp-N和胰蛋白酶(或Lys-C)消化物的数据得到最好的结果。如图17A所示,用Asp-N得到的序列覆盖率为75.4%。对于胰蛋白酶,在图17B中所示,获得的序列覆盖率为56.9%。在这些分析中各分析鉴定的肽分别示于表9和10中。对于Asp-N和胰蛋白酶消化物的相关LC-MS色谱图分别示于图17C和17D中。对于Lys-C的序列覆盖率为66.9%(数据未示出)。通过组合来自Asp-N和胰蛋白酶/赖氨酸-C消化物的结果获得的序列覆盖率低于100%。这是由于BiopharmaLynx无法识别大的肽。由于533的大重复区域,预期来自ASP-N的两个肽是氨基酸107-178和179-267。这两个肽的理论分子量分别为7,178.2Da和8,971.2Da。通过手动检查原始数据,我们在ASP-N消化物的色谱图中观察到两种肽。通过质谱(使用MaxEnt1)鉴定这些肽,并分别在30.5和29.1分钟洗脱。从相应峰的解卷积谱如图18所示。总之,通过组合使用BiopharmaLynx的自动化处理和人工处理,Asp-N加胰蛋白酶/赖氨酸-C蛋白消化物允许100%的序列覆盖。

[0470] 表9. 通过533-128的Asp-N消化鉴定的肽



[0471]

肽	片段数	开始	结束	修饰剂	对照 RT (Min)	对照强度 (计数)	对照质量 误差(ppm)
QEYQCYGSSSNTRVLN	1:D001-002*	1	16	腺甲基化 C(1)	28.65	158656	4.8
QEYQCYGSSSNTRVLNELNY	1:D001-003*	1	20	腺甲基化 C(1)	39.37	85989	12.7
YGSSSNTRVLNELNY	1:D002-003n4	6	20		37.57	9254	10.8
NTRVNLNELYDNAGTINLYN	1:D002-004n9	11	29		50.15	12691	32.6
ELNY	1:D003	17	20		21.71	149477	4.8
ELN	1:D003c1	17	19		5.32	15893	0.5
NYDNAAGTINLYN	1:D003-004n2*	19	29	酰胺 N(3)	22.7	39561	0.2
NYDNAAGTINLYN	1:D003-004n2*	19	29	酰胺 N(3)	37.99	12770	31
DNAGTINLY	1:D004c1	21	28		24.5	150878	2.9
DNAGTINLYNEL	1:D004-005	21	31		38	86383	9.5
DNAGTINLYNELEMMYYG	1:D004-006c2	21	37		41.47	51418	20.5
DNAGTINLYNELEMMYY	1:D004-006c3*	21	36	酰胺 N(3)	31.84	10893	12.4
TNLYN	1:D004n4*	25	29	酰胺 N(2)	2.54	132024	-22.2
NELEMNYYGKQ	1:D004-006n8	29	39		31.63	25600	6.8
ELEMNYYGKQENWYSLKKN	1:D005-007c5	30	48		38.79	8428	12
EMNYYGKQENWYSLKKNRSRSLGEN	1:D006-008	32	55		34.42	94905	9.1
EMNYYGKQENWY	1:D006-007c10	32	43		35.48	28164	7.9
GKQENWYSLKKNRSRSLG	1:D006-007n5	37	53		45.07	17480	56.6
GKQENWYSLKKNRSRSLGEN	1:D006-008n5	37	55		28.9	8719	8
ENWYSLKKNRSRSLGEND	1:D007-009	40	56		31.15	23689	7.4
ENWYSLKKNRSRSLGEN	1:D007-008	40	55		30.98	22273	5.4
ENWYSLKKNRSR	1:D007c3	40	50		43.42	13018	44
ENWYSLKKNRSRSLGEN	1:D007-008*	40	55	酰胺 N(3)	28.65	12480	-30.8
ENWYSLKKNRSR	1:D007c3	40	50		47.53	9928	-0.5
SLKKNRSRSLGEND	1:D007-009n4	44	56		3.02	19034	5.9
SLKKNRSRSLGEN	1:D007-008n4	44	55		2.89	14807	7.2
SLKKNRSRSLGEN	1:D007-008n4	44	55		34.62	8635	-9.8
SRSLGEND	1:D007-009n6*	49	56	酰胺 N(1)	11.42	48611	-47.6
DNEKLRKPKHKKKLQOPA	1:D012-013	62	73		2.72	80488	6.3
DGNPDNPNANPNV	1:D014-015	79	90		22.7	216445	0.3
DPNANPNV	1:D015	83	90		11.4	418052	1.9
DPNANPN	1:D015/b7	83	89		11.42	9817	2.4
DPNANPNVDPNANPNANPNNA	1:D017-018c63*	99	118	酰胺 N(1)	9.09	115535	-1
ANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNV	1:D018n39*	146	178	酰胺 N(7)	37.99	152472	57.4
NPANPNANPNANPNANPNANPNANPNKNNQCGNQGHNMPN	1:D019n56*	235	267	酰胺 N(6)	35.77	12795	56.8
ANPNANPNANPNANPNKNNQCGNQGHNMPNDPNRN	1:D019-020n63*	242	273	氧化 M(1)	38.05	145409	25.8
ANPNANPNANPNANPNKNNQCGNQGHNMPNDPNRMV	1:D019-020n63*	242	273	酰胺 N(1); 氧化 M(1)	38.91	11171	29
NGQGHNMPN	1:D019n80*	259	267	酰胺 N(1)	3.22	15921	-1.1
DPNPNV	1:D020	268	273		2.94	95085	1.8
DPNPNV/DEN	1:D020-022c12*	268	276	酰胺 N(3)	35.53	15005	25.6
DPNPNV/DENANANSVAVKN	1:D020-022c3*	268	285	酰胺 N(2)	28.65	8377	-26.8
DENANANSA	1:D021-022c6	274	282		24.5	14743	-15.4
DENANAN	1:D021-022c8*	274	280	酰胺 N(1)	2.83	13967	-34.7
ENANANSVAVKNN	1:D022c2	275	286		22.7	28933	-50.9
ENANANSVAVKNN	1:D022c2	275	286		38	19106	-26.9
SAVKNNNN	1:D022n6*	281	288	酰胺 N(2)	11.43	15975	-20.2
EPSDKHIKEYLNK	1:D024-026c7	290	302		37.58	14357	22.6
EPSDKHIKEYLNKIQNSLST	1:D024-026*	290	309	酰胺 N(2)	39.47	10482	13
DKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCG	1:D025-027c15*	293	319	腺甲基 C(2)	45.44	43612	14.1
DKHIKEYLNKIQNSLS	1:D025-026c1	293	308		37.58	35342	10.6
DKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPK	1:D025-027*	293	335	酰胺 N(1) 腺甲基 C(2)	44.27	17896	0.3
DKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCGN	1:D025-027c15*	293	320	酰胺 N(2) 腺甲基 C(2)	35.71	13119	-11.9
KHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPK	1:D025-027n1*	294	335	腺甲基 C(2)	45.15	36065	-5.4
KHIKEYLNKIQNSLST	1:D025-026n1*	294	309	酰胺 N(1)	38.61	12232	25.8
EYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPK	1:D026-027*	298	335	腺甲基 C(2)	43.63	83604	7.2

[0472] 表9以出现顺序分别公开了SEQ ID NO:29-34、34-48、47-50、50-59、59-66和66-76。

[0473] 表10.通过533-128的胰酶消化鉴定的肽

[0474]

肽	片段数	开始	结束	修饰剂	对照 RT (Min)	对照强度 (计数)	对照质量 误差(ppm)
OEYOCYSSSNTR	1:T001*	1	13	羧甲基 C(1)	15.98	57587	7.6
VLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002	14	38		50.69	583021	9
VLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002*	14	38	氯化 M(1)	49.94	98974	6.2
VLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002*	14	38	脱酰胺 N(1)	50.31	24563	12.6
VLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQ	1:T002-003c7	14	39		48.65	21116	21
VLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002*	14	38	脱酰胺 N(1)	51.3	13665	13.1
ELNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002n3	17	38		48.39	12990	11
LNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002n4*	18	38	脱酰胺 N(1)	44.54	14186	25.5
LNYDNAGTNLYNELEMNYYGK	1:T002n4	18	38		44.13	11839	20.4
YDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSLK	1:T002-003n6*	20	46	脱酰胺 N(3)	46.21	22882	34.8
TNLYNELEMNYYGKQENWYSLK	1:T002-003n11*	25	46	脱酰胺 N(3), 脱酰胺 Q(1), 氯化 M(1)	30.17	11786	-48
YNELEMNYYGKQENWYSLKK	1:T002-004n14*	28	47	氯化 M(1)	43.05	30770	2.3
QENWYSLK	1:T003	39	46		34.21	276972	9
QENWYSLKK	1:T003-004	39	47		29.94	179253	0.8
QENWYSLKK	1:T003-004*	39	47	脱酰胺 N(1)	33.38	14607	-9.6
SLGENDDGNNEDEKLR	1:T006-007	51	67		21.71	245881	2.3
SLGENDDGNNEDEK	1:T006	51	65		3.36	142740	6.1
LGENDDGNNEDEK	1:T006n1	52	65		24	56530	0.8
DNEKLRKFK	1:T006-008n11*	62	70	脱酰胺 N(1)	29.5	17038	-29.4
LKQPADGNPDPNANPNVDPNANPNVD	1:T011-012c155	74	99		29.86	11983	8.2
PNANPNANPNKNNQGNQGGHNPNDPNR	1:T012-013n168*	244	271	氯化 M(1)	48.63	21238	26
PNANPNKNNQGNQGGHNPNDPNR	1:T012-013n172*	248	271	氯化 M(1)	42.59	14992	31.1
NNQGNQGGHNPNDPNR	1:T013*	255	271	脱酰胺 N(1)	3.59	79962	9.2
NNQGNQGGHNPNDPNR	1:T013	255	271		3.22	16516	10.8
NNQGNQGGHNPMPN	1:T013c4*	255	267	脱酰胺 N(2)	7.67	12541	46.7
GHNPNDPNRNVDENANANSVAVK	1:T013-014n7	262	284		44.54	173876	22
NVDENANANSVAVK	1:T014	272	284		7.89	272740	1.1
NVDENANANSVAVKNNNNE	1:T014-015c5*	272	289	脱酰胺 N(3)	48.18	22174	56.2
NNNNEEPSDK	1:T015	285	294		2.72	16507	3.4
HIKEYLNKIQNSLSTEW	1:T016-018c14	295	311		42.98	20256	44.8
HIK	1:T016	295	297		2.85	14221	5.8
EYLNK	1:T017	298	302		5.47	85875	8.3
EYLNK	1:T017-H2O	298	302		5.48	32286	0.3
IQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVR	1:T018*	303	325	脱酰胺 N(1), 羧甲基 C(2)	43.05	214747	10.7
IQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVR	1:T018*	303	325	羧甲基 C(2)	42.59	127446	12
IQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRKPG	1:T018-019c6*	303	329	脱酰胺 N(2), 脱酰胺 Q(2), 羧甲基 C(2)	50.69	32319	-22.8
IQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRKPG	1:T018-019c6*	303	329	脱酰胺 N(2), 脱酰胺 Q(2), 羧甲基 C(2)	49.94	11828	-11.4
IKPGSANKPKDELVDYANDIEKK	1:T019-021	326	347		28.83	384069	10.2
IKPGSANKPKDELVDYANDIEK	1:T019-020	326	346		30.18	304498	3.9
IKPGSANKPKDELVDYANDIEKK	1:T019-021*	326	347	脱酰胺 N(1)	26.69	22585	11.8
IKPGSANKPKDELVDYANDIEK	1:T019-020*	326	346	脱酰胺 N(1)	28.2	13388	5.1
DELVDYANDIEK	1:T020	336	346		32.48	71581	1.6
DELVDYANDIEKK	1:T020-021	336	347		30.92	68525	-1.7
CSSVFNVVN	1:T024*	354	362	羧甲基 C(1)	36.85	157656	4
CSSVFNVV	1:T024*bb*	354	361	羧甲基 C(1)	36.85	15354	7.6

[0475] 表10以出现顺序分别公开了SEQ ID NO:77-78、78、78-79、78、80-81、81-86、86-94、94-101、101-102、102-103、103-105和104-109。

[0476] 9. 宿主细胞分析

[0477] 宿主细胞蛋白 (HCP) 测定

[0478] 使用“Immunoenzymetric Assay for the Measurement of Pseudomonas fluorescens Host Cell Proteins”试剂盒进行宿主细胞蛋白 (HCP) ELISA, 该试剂盒来自 Cygnus Technologies公司, 目录号F450。使用制造商的方案进行了测定。

[0479] Q-PCR宿主细胞DNA测定

[0480] 为了分析宿主细胞DNA, 设计针对DNA聚合酶I基因和表达质粒骨架序列的寡核苷酸引物用于通过通过实时定量PCR检测荧光假单胞菌DNA。通过Integrated DNA Technologies公司合成引物。用DNA Engine Opticon System PTC-200DNA Engine Cycler (MJ Research, CFD-3200Opticon) 进行实时PCR。

[0481] 10. 内毒素测定

[0482] 使用Endosafe-PTS便携式内毒素分析仪 (Charles River实验室 (CHL)) 根据制造

商提供的操作流程分析在洗脱级分中的内毒素,其使用具有1-0.01EU/mL (CHL, 部件号PTS2001F) 和10-0.1EU/mL (CHL, 部件号PTS201F) 灵敏度范围的药盒。

[0483] 实施例3:rCSP的纯化及rCSP二聚体的优先还原

[0484] 使用基于实施例2中描述的结果确定的方法获得纯化的重组CSP,其中所述纯化的rCSP二聚体经历优先还原条件并分离成单体。对于所有实验获得了36%的总体过程产率并通过LC-MS观察0%的降解种类。

[0485] 概述:

[0486] 将荧光假单胞菌发酵全发酵液(10升)转移到收获容器用于初级回收。首先用3.1M尿素,31mM的Tris,pH 8.2稀释发酵全发酵液以达到 $\leq 20\%$ 固形物的均质化进料。通过微射流将稀释的发酵液裂解,产生细胞裂解物。用2M尿素,20mM的Tris,pH 8.2以1:1稀释裂解物,产生10%固形物的裂解物。通过盘栈离心和深度过滤从含rCSP的缓冲液分离裂解物中的荧光假单胞菌固形物。然后将含rCSP的缓冲液进一步0.2 $\mu\text{m}$ 过滤并冷冻。一部分rCSP澄清细胞提取物一旦解冻通过阴离子交换色谱法(AEX)纯化。收集含rCSP的AEX洗脱物并通过羟磷灰石色谱(HA)进一步纯化。收集含有rCSP的HA洗脱物和存储在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。一旦将HA洗脱物返回至室温和进行0.2 $\mu\text{m}$ 过滤,rCSP经历优先还原条件。将缓冲液中含有二聚化CSP的色谱洗脱级分汇合到200-600mL的最终体积。通过加入二硫苏糖醇还原剂(JT Baker, 部件号JT-F780-2,Phillipsburg,NJ)至20 $\mu\text{M}$ 的终浓度使汇合物经历优先还原,并用磁力搅拌棒和搅拌板在室温下快速搅拌12-24小时。可选择地,通过在进行选择还原之前首先向材料加入2M尿素将PBS中聚集的rCSP(例如,批次533-128)进行同样的处理。

[0487] 在经历优先还原条件之后,将rCSP浓缩,并通过TFF渗滤到制剂缓冲液中。然后将渗滤的rCSP通过最终的0.2 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤以得到大批药物物质。

[0488] 对于两个整合纯化的纯化概述示于表11中。在500克冷冻的细胞糊上主回收步骤,并通过深度过滤处理,大约85%的回收率和8%的纯度。然后将该物质在TMAE柱(运行533-402和运行533-404)上进行色谱分析,具有83%的平均回收率和78%的纯度(图19和图20)。然后将TMAE池经过陶瓷羟磷灰石I型(运行533-403和运行533-405),具有69%的平均回收率和通过SDS-CGE的96%纯度(图21和22)。然后将CHT材料进行轻度还原处理和通过TFF缓冲液交换到PBS中,具有 $\sim 75\%$ 的产率和通过SDS-CGE的96%最终纯度。通过在280nm处的吸光度对于批次533-406和533-407,rCSP浓度分别确定为1.0mg/mL和1.2mg/mL(表11)。然后将纯化的rCSP(批次533-406和533-407)等分并存储在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下进行额外的分析和表征,如下面所讨论的。对于两个整合的运行的总体纯化产率为约36%,代表优于较早阶段的纯化过程的大约10倍的改善。例如,涉及阴离子交换接着是疏水相互作用色谱和在小规模(具有起始材料中少于0.5g的rCSP)进行的较早阶段的方法对于CS533-129产生3.2%的总体过程产率,对于CS533-211产生6.5%的总体过程产率,和对于CS533-249(表达与pbp前导肽融合的SEQ ID NO:3的rCSP)产生3.1%的总体过程产率。

[0489] 如图23所示,用SDS-PAGE分析纯化的物质和测定的纯度与SDS-CGE一致(纯度 $> 95\%$ )。Western印迹分析确认身份并显示低片段化(图24)。对含有两个二硫键的C-末端结构域敏感的构象特异性抗体(4C2)表现出强信号(2)。还原的和烷基化的样品显示信号的损失,这表明纯化的rCSP具有正确的二硫键结构(图24)。对于两个批次的内毒素 $< 10\text{EU}/\text{mg}$ (表11)。对于两种纯化HCP-ELISA测定宿主细胞蛋白在 $\sim 4000\text{ppm}$ (表11),其中与通过SDS-CGE

测量的96%纯度一致。宿主DNA(基因组)通过Q-PCR测量为78-98pg/mg(表11)。对于两种制剂,通过SE-HPLC的分析显示<5%的二聚体和无HMW聚集体(图25和表11)。对于两种制剂,RP-HPLC显示11%的二聚体(表11)和峰特征与533-191参考相一致(图26)。对于批次533-406和533-407,完整质量与理论分子量是一致的,在N-末端没有可检测的剪切(图27)。对于两种制剂使用Glu-C蛋白水解的肽作图分析与533-191参照相比(图28)。此分析表明邻近N-末端的半胱氨酸是游离的,且二硫键是完整的(未示出)。制剂的电荷异质性匹配533-191内部基准特征(图29)。由于样品浓度的差异,观察到pI峰的强度的略微差异。对于这两种制剂,远UV-CD分析与参考材料是相似的(图30A)。使用K2D2软件的分析计算出对于批次533-406的10.45% $\alpha$ -螺旋和29.09%的 $\beta$ -链,对于批次533-407的10.45% $\alpha$ -螺旋和29.09%的 $\beta$ -链及对于533-191参考的10.04% $\alpha$ -螺旋和29.65% $\beta$ -链。对于这两种制剂的固有荧光光谱与参考材料匹配(图30B)。

[0490] 总之,来自整合纯化运行的批次533-406和533-407是高品质和纯度的,并满足该方案阶段的所有分析指标。对比分析表明制剂之间的最小差异以及与533-191参考标准的差异。

[0491] 表11A. 整合纯化运行的纯化概述(批次533-406)

[0492]

	收获/澄清	TMAE HiCap	陶瓷 HA	还原& HF/DF
方案号	533-387 (533-252 paste)	533-402	533-403	533-406
规模	500g	151 mL CV	85 mL CV	160 mL
载量(mg)		518	340	224
产率(mg)	3240	453	238	168
步骤回收率	85%	81%	70%	75%
总体回收率	85%	69%	48%	36%
CGE 纯度	8%	79%	96%	96%
CGE 浓度(mg/ml)	0.37	0.6	0.75	0.8
Q-Page 浓度(mg/ml)	0.81	1.0	1.4	0.9
通过 A280 的浓度			1.5	1.0
HPLC-SEC (%二聚体)				2.5
RP (%二聚体)			77%	11%
质谱(%剪切的)		4.1%	0%	0%
HCP ELISA (ppm)				4123
宿主基因组 DNA (pg/mg)				98.0
宿主质粒 DNA (pg/mg)				7.4
内毒素(EU/mg)		n/a		4.3
Western 印迹				阳性带; 无片段
肽作图				游离 N-末端半胱氨酸 4.95、5.02、5.16、5.31 处的 pI 峰; 另外的较小峰
cIEF				
CD				$\alpha$ 螺旋=10.45%; $\beta$ 链=29.9%
固有荧光				与标准一致

[0493] 表11B. 整合纯化运行的纯化概述(批次533-407)

[0494]

	收获/澄清	TMAE HiCap	陶瓷 HA	还原 & HF/DF
方案号	533-387 (533-252 paste)	533-404	533-405	533-407
规模	500g	151 mL CV	85 mL CV	150 mL
载量 (mg)		644	408	255
产率 (mg)	3240	544	272	190
步骤回收率	85%	84%	67%	75%
总体回收率	85%	71%	48%	36%
CGE 纯度	9%	76%	96%	96%
CGE 浓度 (mg/ml)	0.4	0.6	0.9	1.0
Q-Page 浓度 (mg/ml)	0.8	1.2	1.7	1.2
通过 A280 的浓度			1.8	1.2
HPLC-SEC (%二聚体)				4.2
RP (%二聚体)			67%	11%
质谱 (%剪切的)				0%
HCP ELISA (ppm)				4093
宿主基因组 DNA (pg/mg)				76.0
宿主质粒 DNA (pg/mg)				4.5
内毒素 (EU/mg)				6.5
Western 印迹				阳性带; 无片段
肽作图				游离 N-末端半胱氨酸
cIEF				4.93、5.03、5.16、5.32 处的 pI
CD				峰; 另外的较小峰
Intrinsic Fluorescence				$\alpha$ 螺旋=10.45%; $\beta$ 链=29.09%
				与标准一致

[0495] 实施例4:从5升发酵纯化rCSP

[0496] 如实施例43中所述的本发明的纯化方法,用于从具有含SEQ ID NO:5的表达载体的荧光假单胞菌表达菌株的5升发酵培养物得到纯化的rCS。N-末端的降解被确定为5.1%。总体过程产率是60%。

[0497] 实施例5:纯化由SEQ ID NO:6编码的rCSP

[0498] 如实施例3中使用的本发明的纯化方法用于从具有含SEQ ID NO:6的表达载体的荧光假单胞菌表达菌株培养物获得rCSP。SEQ ID NO:6是编码如SEQ ID NO:3所示的rCSP的优化CSP核苷酸序列。CSP基因与pbp分泌前导肽编码序列融合。

[0499] 实施例6:用于优先还原缓冲液的还原剂浓度的优化

[0500] 在实施例1中描述的一般策略之后,如使用DTT那样测试其它还原剂以确定用于将rCSP二聚体优先还原为单体形式而不变性蛋白质的最佳浓度。测试的其它还原剂包括DTT、半胱氨酸、谷胱甘肽、单硫代甘油、巯基乙酸、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、乙酰半胱氨酸、2-巯基乙醇(B-巯基乙醇)、TCEP-HCl(纯结晶三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐)或2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)。

[0501] 实施例7:单硫代甘油作为还原剂的评估

[0502] 对其它还原剂/条件进行评估以优化rCSP单体的产生。这包括测试缓冲剂和程序以进一步提高rCSP在液体形式中的稳定性。基于其对rCSP的降解、二聚化和聚集的影响评估试剂将rCSP保持为活性单体的能力。这些研究表明,rCSP可以在含有单硫代甘油和精氨酸的PBS缓冲液中于4°C下维持在>85%的单体含量长达23天。

[0503] 在实验中证实了精氨酸的稳定化效果,其中将单独的精氨酸以及精氨酸与还原剂单硫代甘油掺入PBS,pH 7.2中的rCSP样品中。缓冲液交换后通过超滤/渗滤至含有单硫代

甘油和精氨酸的PBS中,进一步的研究测得80%的rCSP单体含量。该稳定性的水平是用浓度从1mg/mL至>5mg/mL的rCSP证明的。另一方面,含有甘露糖醇、单硫代甘油和精氨酸的Tris和组氨酸缓冲液表现出总rCSP的约11%的聚集体形成。

[0504] 通过液相色谱/质谱(LC/MS)和SDS-PAGE分析反相HPLC的洗脱级分以确定分子量和化学结构的差异。这些研究表明,RP-HPLC洗脱物的级分含有具有焦谷氨酸部分的rCSP。比较在三个pH水平下的含有1mM单硫代甘油和10%w/v的精氨酸的PBS中重组CSP的稳定性的研究表明,含焦谷氨酸的级分随时间增加,因为其中不含焦谷氨酸盐的天然rCSP的级分下降。21和23天后在4°C和pH 6.4下对于总rCSP的稳定水平与pH 7.0下的稳定性相当;在25°C下,稳定性经过相同的时间段显著下降。

[0505] 使用对于实施例2中的内部参考标准制剂所描述的方法,使用从菌株CS533-129制备的rCSP进行这些研究。除非另有说明,所有方法如实施例2中所描述。

[0506] 掺入研究

[0507] 为了将rCSP稳定为活性单体,评估多种制剂缓冲液赋形剂减少或防止rCSP的二聚化、聚集和的总体降解的能力。

[0508] 掺入实验1:还原剂和精氨酸对rCSP稳定性的影响

[0509] 测试一组还原剂在防止rCSP二聚体形成中的有效性。所测试的还原剂是单硫代甘油(MTG)、L-半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽和巯基乙酸。结合各还原剂测试精氨酸作为用于降低rCSP聚集速率的方法。在小规模的稳定性实验中使用所述试剂,其中在存在和不存在1%的精氨酸的情况下,向rCSP的单个样品(1mg/mL在PBS,pH 7.2中)各掺入6种还原剂之一。

[0510] 将样品保持在室温(25°C)下3、6或14天,然后通过SE-HPLC进行分析。如实施例2中所描述的进行HPLC。观察了四个不同的峰区域:第一区域含有高分子量(HMW)rCSP聚集体;第二峰区域包含rCSP二聚体;第三峰区域包含rCSP单体;最后的洗脱峰区域包含低分子量的降解产物。

[0511] 与在其它赋形剂(表12A-C)中存储相同时间的样品相比,保持在掺有单硫代甘油(MTG)、半胱氨酸或乙酰半胱氨酸的PBS中的rCSP样品在6和14天时在主(单体)峰中具有最高的蛋白质百分比,和在高分子量(聚合物)和低分子量(降解产物)峰中具有最低百分比。“主峰”列表明rCSP单体百分比。

[0512] 表12A. 掺入实验1:存储3天的rCSP的SE-HPLC

[0513]

样品		第3天 (02162B)							
		HMW 峰		二聚体峰		主峰		LMW 峰	
ID		面积	%	面积	%	面积	%	面积	%
533-462-1	乙酰半胱氨酸(1mM)	223	10	0	0	1809	78	292	13
533-462-2	半胱氨酸(1mM)	365	11	0	0	2438	75	430	13
533-462-3	单硫代甘油(1mM)	385	13	0	0	2509	85	69	2
533-462-4	谷胱甘肽(1mM)	432	14	0	0	2470	80	170	6
533-462-5	巯基乙酸(1mM)	769	22	0	0	2270	66	387	1
533-462-6	乙酰半胱氨酸(1mM)+ 精氨酸(1%)	268	10	0	0	2205	82	215	8
533-462-7	半胱氨酸(1mM)+精氨酸(1%)	316	11	0	0	2240	81	202	7
533-462-8	单硫代甘油(1mM)+精氨酸(1%)	259	10	0	0	2190	85	117	5
533-462-9	谷胱甘肽(1mM)+精氨酸(1%)	300	10	0	0	2322	79	317	11
533-462-10	巯基乙酸(1mM)+精氨酸(1%)	585	19	0	0	1967	65	472	16
533-462-11	精氨酸(1%)	506	18	112	4	2049	73	128	5
533-462-12	仅 PBS	606	25	75	3	1693	70	43	2

[0514] 表12B. 掺入实验1: 存储6天的rCSP的SE-HPLC

[0515]

样品		第6天 (02202B)							
		HMW 峰		二聚体峰		主峰		LMW 峰	
ID		面积	%	面积	%	面积	%	面积	%
533-462-1	乙酰半胱氨酸(1mM)	77	4	0	0	1837	86	227	11
533-462-2	半胱氨酸(1mM)	282	10	0	0	2218	76	431	15
533-462-3	单硫代甘油(1mM)	373	13	0	0	2397	81	177	6
533-462-4	谷胱甘肽(1mM)	524	17	0	0	2196	66	391	12
533-462-5	巯基乙酸(1mM)	728	22	0	0	2196	66	391	12
533-462-6	乙酰半胱氨酸(1mM)+ 精氨酸(1%)	212	9	0	0	1881	84	147	7
533-462-7	半胱氨酸(1mM)+精氨酸(1%)	334	12	0	0	2090	75	375	13
533-462-8	单硫代甘油(1mM)+精氨酸(1%)	213	9	0	0	1909	82	204	9
533-462-9	谷胱甘肽(1mM)+精氨酸(1%)	258	10	0	0	2102	79	317	12
533-462-10	巯基乙酸(1mM)+精氨酸(1%)	572	19	0	0	1928	63	562	18
533-462-11	精氨酸(1%)	659	27	131	5	1452	59	207	8
533-462-12	仅 PBS	972	40	107	4	1288	53	53	2

[0516] 表12C. 掺入实验1: 保存14天的rCSP的SE-HPLC

[0517]

样品		第 14 天 (02282B)							
		HMW 峰		二聚体峰		主峰		LMW 峰	
ID		面积	%	面积	%	面积	%	面积	%
533-462-1	乙酰半胱氨酸(1mM)	519	23	0	0	1349	60	386	17
533-462-2	半胱氨酸(1mM)	597	20	0	0	1886	64	449	15
533-462-3	单硫代甘油(1mM)	680	25	0	0	1716	63	346	13
533-462-4	谷胱甘肽(1mM)	901	27	0	0	1739	50	708	21
533-462-5	巯基乙酸(1mM)	793	24	0	0	1648	50	869	26
533-462-6	乙酰半胱氨酸(1mM) + 精氨酸(1%)	326	14	0	0	1621	68	427	18
533-462-7	半胱氨酸(1mM)+精 氨酸(1%)	395	15	0	0	1927	71	384	14
533-462-8	单硫代甘油(1mM)+ 精氨酸(1%)	283	12	0	0	1737	73	344	15
533-462-9	谷胱甘肽(1mM)+精 氨酸(1%)	342	12	0	0	1731	61	768	27
533-462-10	巯基乙酸(1mM)+精 氨酸(1%)	588	20	0	0	1641	56	676	23
533-462-11	精氨酸(1%)	1156	44	277	11	927	36	251	10
533-462-12	仅 PBS	1427	57	137	5	813	32	140	6

[0518] 只掺有1%的精氨酸的样品表明,从3天至14天,二聚体峰和高分子量聚集体峰的尺寸增加以及单体峰的尺寸减小。也对精氨酸与其它赋形剂的组合进行评估。

[0519] 添加精氨酸在3天和6天对单体比例有小的影响,但在14天,还原剂加精氨酸产生了比单独的还原剂高9%至23%的单体量。单硫代甘油加精氨酸比半胱氨酸加精氨酸在主峰中保持高2%的材料量和比乙酰半胱氨酸加精氨酸高5%的量。

[0520] 掺入实验2:单硫代甘油和精氨酸对rCSP稳定性的影响

[0521] 进行一组实验以评估在掺有MTG和较宽浓度范围的精氨酸的PBS, pH 7.2中的rCSP稳定性。在仅PBS、仅1mM的MTG或1mM的MTG加1、5、10或20%的精氨酸中将样品保持3或12天。通过SE-HPLC分析蛋白质稳定性。在单独的MTG中,从第3天到第12天,主单体峰相对尺寸减小而低分子量的峰相对尺寸增大。精氨酸浓度增加导致在主(单体)峰中总蛋白的百分比增加。精氨酸的浓度增加也导致了低分子量(MW)峰中的每个样品逐渐增高的百分比和在高MW峰中逐渐降低的百分比,其表明精氨酸对聚集体形成的抑制作用。在MTG中的所有样品显示,在二聚体峰中没有材料;仅在单独PBS中保持的样品显示二聚化(表13A和B)。

[0522] 表13A. 掺入实验2:存储3天的rCSP的SE-HPLC



[0523]

样品		第 3 天 (02202C)							
		HMW 峰		二聚体峰		主峰		LMW 峰	
ID	赋形剂	面积	%	面积	%	面积	%	面积	%
533-468-1	单硫代甘油(1mM)	296	15	0	0	1645	85	0	0
533-468-2	单硫代甘油(1mM)+1% 精氨酸	238	13	0	0	1624	87	94	5
533-468-3	单硫代甘油(1mM)+5% 精氨酸	155	8	0	0	1829	92	232	10
533-468-4	单硫代甘油(1mM) +10%精氨酸	120	6	0	0	1891	94	328	14
533-468-5	单硫代甘油(1mM) +20%精氨酸	67	3	0	0	1911	97	528	21
533-468-6	仅 PBS	435	28	0	0	1093	72	0	0

[0524] 表13B. 掺入实验2: 存储12天的rCSP的SE-HPLC

[0525]

样品		第 12 天(02292A)							
		HMW 峰		二聚体峰		主峰		LMW 峰	
ID	赋形剂	面积	%	面积	%	面积	%	面积	%
533-468-1	单硫代甘油(1mM)	390	23	0	0	1296	77	473	22
533-468-2	单硫代甘油 (1mM)+1%精氨酸	247	16	0	0	1289	84	258	14
533-468-3	单硫代甘油 (1mM)+5%精氨酸	137	8	0	0	1660	92	430	19
533-468-4	单硫代甘油(1mM) +10%精氨酸	102	5	0	0	1762	95	435	19
533-468-5	单硫代甘油(1mM) +20%精氨酸	56	3	0	0	1578	97	628	28
533-468-6	仅 PBS	859	53	109	7	657	40	0	0

[0526] 选择单硫代甘油与10%的精氨酸用于随后的浓度和pH稳定性实验中。含有20%的精氨酸的制剂得到稍好的稳定性结果。用于所测试的赋形剂制剂的SE-HPLC数据总结于表13中。来自掺入实验1和2的样品没有在SDS-CGE中表现出显著断裂且全部显示了在对于rCSP预期的分子量处的主带。

[0527] 浓度研究

[0528] 评估了在1mM的MTG加10%的精氨酸中浓缩至5mg/ml的rCSP的稳定性。在离心浓缩机上将在具有1mM的MTG和10%的精氨酸的PBS中的或在单独的PBS中的rCSP样品浓缩8倍。以0.8mg/ml的起始浓度和以6.4mg/ml在有或没有4℃下的16小时保持步骤对样品进行SE-HPLC。在单独的PBS中,8倍浓缩后单体从86%下降到50%;浓缩后添加16小时的保持,单体峰下降到29%。在1mM的MTG加10%的精氨酸中的rCSP样品显示高得多的稳定性。经过8倍浓缩,主单体峰从86%下降到80%,且经16小时保持完全没有下降。相对峰大小的数据总结于表14中。这些数据证实了掺入研究的结果,并表明可以得到浓缩至5mg/ml而没有rCSP单体的急剧降低。

[0529] 表14. 对于浓缩样品的相对SE-HPLC峰大小

[0530]

条件	HMW 峰	二聚体 峰	主峰
	%	%	%
以 PBS 开始	14	-----	86
浓缩 8X 至约 6.4 mg/mL	49	1	50
浓缩 8X 至约 6.4 mg/mL, 在 4°C 保持 16 小时	71	-----	29
以 PBS+1 mM MTG+10 %精氨酸开始	14	-----	86
PBS+1 mM MTG+10 %精氨酸, 浓缩 8X 至约 6.4 mg/mL	16	4	80
PBS+1 mM MTG+10 %精氨酸, 浓缩 8X 至约 6.4 mg/mL, 在 4°C 保持 16 小时	17	3	80

[0531] 使用非PBS缓冲液的缓冲液交换

[0532] 在Tris和组氨酸缓冲液中测试含4.2%甘露糖醇、2%精氨酸、1mM的MTG和10 $\mu$ M的乙二胺四乙酸(EDTA)的制剂(表15)。进行这些实验来测试缓冲系统对rCSP的稳定化效应。通过超滤/渗滤(UF/DF)缓冲液交换之后评估稳定性。

[0533] 表15. 非PBS缓冲液制剂

实验号	制剂	原料
[0534] A	10 mM Tris 碱, 4.2%甘露糖醇, 2%精氨酸-HCl, 100 $\mu$ M EDTA, 1mM MTG, pH 7.5	CHT 洗脱物+20 $\mu$ M DTT, 0.27 mg/mL
B	10 mM 组氨酸, 4.2%甘露糖醇, 2% 精氨酸-HCl, 100 $\mu$ M EDTA, 1 mM MTG, pH 7.0	CHT 洗脱物+20 $\mu$ M DTT, 0.27 mg/mL

[0535] 在这两个实验A和B中, 将来自陶瓷羟磷灰石(CHT)柱的洗脱物进行轻度还原, 然后通过UF/DF交换进入测试赋形剂缓冲液中。对于UF/DF处理, 通过超滤将轻度还原的CHT洗脱物浓缩至1.0mg/ml并针对过6倍渗滤体积的指定制剂渗滤。从系统回收前, 将渗余物进一步浓缩至约5.0mg/ml, 并进行0.22 $\mu$ m过滤。SE-HPLC的分析显示对于两种赋形剂制剂, 保持2天或更长时间的样品表现出11%的聚集体形成。在交换到10mM的Tris碱, 4.2%甘露糖醇, 2%精氨酸-HCl, 100 $\mu$ M的EDTA, 1mM的单硫代甘油, pH 7.5中的轻度还原CHT洗脱物中的蛋白质上进行的SE-HPLC数据总结在表16中(UF<sub>1</sub>=0.0小时至-1.0小时; DF=1.0小时至4.5小时; UF<sub>2</sub>=4.5小时至5.0小时)。

[0536] 在交换到10mM的组氨酸、4.2%甘露糖醇、2%精氨酸-HCl、100 $\mu$ M的EDTA、1mM的单硫代甘油, pH 7.0中的轻度还原CHT洗脱物的蛋白质上进行的SE-HPLC数据总结在表17中(UF<sub>1</sub>=0.0小时至1.0小时; DF=1.0小时至4.5小时; UF<sub>2</sub>=4.5小时至5.0小时)。

[0537] 表16. 通过切向流过滤(UF/DF)缓冲液交换至Tris缓冲液中(533-536)。

[0538]

533-536	聚集体%	二聚体%	单体%	LMW%
还原后, 0.43 g/L	-----	-----	96	4
	-----	-----	100(仅 CSP)	-----
还原后, t=24hr	5	-----	95	-----
最终 UF 1, 1 mg/ml	-----	1	95	4
	-----	0.5(仅 CSP)	99.5(仅 CSP)	-----
最终 UF 1, 1 mg/ml, t=24hr, RT	-----	2	98	-----
最终 DF, 1 mg/ml	1.0	-----	96	3
	0.7(仅 CSP)	-----	99.3(仅 CSP)	-----
最终 DF, 1 mg/ml, t=24 hr, RT	4	0.5	96	-----
最终 DF, 1 mg/ml, t=48 hr	1.6	-----	98.4	-----
最终 UF 2, 5 mg/ml	2.4	-----	94	3.5
	2.2(仅 CSP)	-----	97.8(仅 CSP)	-----
最终 UF 2, 5 mg/ml, 冷 冻/解冻	4.7	-----	95.3	-----
最终 UF 2, 5 mg/ml, t=24hr, RT	7	-----	93	-----
最终 UF 2, 5 mg/ml, t=48 hr	11	-----	89	-----

[0539] 表17. 通过切向流过滤 (UF/DF) 缓冲液交换至组氨酸缓冲液中 (533-538)。

[0540]

533-538	聚集体%	二聚体%	单体%	LMW%
还原后, 0.43 mg/mL	-----	1	99	-----
最终 UF 1, 1 mg/mL	-----	1	99	-----
最终 DF, 0.9 mg/mL	1.5	-----	98.5	-----
最终 DF, 0.9 mg/mL, t=24 hr	2	-----	98	-----
最终 UF 2, 5 mg/mL	-----	4	96	-----
最终 UF 2, 5.6 mg/mL, t=24 hr	11	-----	89	-----
最终 UF 2, 冷冻/解冻	-----	6	94	-----

[0541] pH稳定性研究

[0542] 在2-8°C和环境温度(~25°C)下,在三个不同的pH水平测试含有1×PBS、0.5M精氨酸和1mM单硫代甘油的制剂缓冲液21天。在每个时间点也对在-70°C的冷冻对照进行分析。通过切向流过滤对样品进行缓冲液交换。然后通过UF/DF将rCSP浓缩至1和5mg/ml和用6N HCl将pH值调节到6.44,和QS'd至1L(批次1,533-551),用10N的NaOH调节至pH 7.0和QS'd至1L(批次2,533-550),或用10N的NaOH调节至pH 7.5和QS'd至1L(批次3,533-549)。时间点通过RP-HPLC在214nm和通过SE-HPLC在280nm分析。在最终时间点处立即分析SE-HPLC样品。在其最终时间点将RP-HPLC样品冷冻在-80°C,然后解冻并进行分析。对于pH为7.0,25°C,21天无可用数据。

[0543] 在三个pH值水平下:6.4、7.0和7.5,对rCSP pH稳定性研究的样品进行RP-HPLC。在这些实验中所分析的样品表现出含天然rCSP的主峰,具有稍迟洗脱的肩,其由具有上面讨论的焦谷氨酸部分的rCSP组成。原始CSP峰和含焦谷氨酸的肩共同组成了代表总rCSP的色谱图面积。观察到三个其它的峰组:第1组在约10分钟处,第2组刚好在主峰前,和第3组刚好在含有焦谷氨酸的肩后。图31示出了储存在4°C,pH 7.5下的1mg/ml rCSP的T0对照稳定性样品中观察到的组1-3峰的相对位置。

[0544] 含有1mg/ml或5mg/ml的rCSP在pH 7.5下的样品(批次3)在T=0通过RP-HPLC分析,或者存储在4°C或25°C下和在5天、14天或21天时进行分析。以相同的方式对在pH 7.0(批次2)和pH 6.4(批次1)下的样品进行时程分析。在所有三个pH水平,原始CSP级分中的材料随时间而减少,而在含焦谷氨酸级分中的材料随时间增加;这观察到保持在25°C的样品比保持在4°C的那些样品的程度明显更大。

[0545] 进行在1和5mg/ml及4°C和25°C下三个pH水平随着时间的并列稳定性数据比较,其使用总CSP级分或仅在原始(主)RP-HPLC峰洗脱的材料,这排除了含焦谷氨酸的肩(表18-20)。对于在4°C下的1mg/ml和5mg/ml的样品,pH 6.4和pH 7.0的缓冲液在14/15天和21/23天比pH7.5的缓冲液提供了更高的稳定性水平。RP-HPLC分析显示,在21/23天pH 6.4和pH 7.0之间,对于1mg/ml的原始rCSP大约2%的稳定性差异,和对于5mg/ml的原始rCSP为1.6%

的稳定性差异。对于原始和总CSP样品,在25℃下的两个浓度,pH 6.4和7.0比pH 7.5值在5/6天提供了更高的稳定性水平,以及在14/15天和21/23天提供了相当的水平。在pH 7.5保持的5mg/mL的样品在21天时,在组1峰的材料中显示出比保持在pH 6.4和pH 7.0的缓冲液中的样品更大的增加。

[0546] 将含有5mg/ml或1mg/ml的rCSP的样品保持在pH 6.4、7.0或7.5的缓冲液中,在4℃或25℃下,且在1/3天、5/6天、14/15天和21/23天通过SE-HPLC进行分析(表21和表22)。观察到峰拖尾的增加,其在相同的时间量内对于保持在25℃的样品中更明显。对于保持在4℃和在25℃的1mg/mL样品趋势是相似的。

[0547] 用1mg/ml和5mg/ml的样品在1/3天、5/6天、14/15天和21/23天在4℃和25℃下对3个pH水平进行并列数据对比。最稳定的样品是那些在pH 7.0的缓冲液中在4℃和25℃及在1mg/ml和5mg/ml下的样品。与RP-HPLC相似,SE-HPLC显示5mg/ml的样品在1、5和14天在25℃下用pH 6.4的缓冲液比用pH 7.0稳定性稍高。在21天的端点,对于pH 7.0比pH 6.4测得稍高的稳定性。

[0548] 表18.pH 7.5的液体制剂(533-549)在4℃和25℃及1mg/ml和5mg/ml的rCSP至最多28天的RP-HPLC相对面积

[0549]

制剂的 rCSP 浓度 (mg/mL)	保持温 度(°C)	保持为液体 的时间(天)	%面积 原始 rCSP	%面积 pE-rCSP	总 rCSP(%面积 原始 rCSP+%面 积 pE-rCSP)
1	n/a	0	62.2	21.2	83.3
1	4	0.92	63.2	20.1	83.3
1	4	4	59.6	23.3	82.9
1	4	5	59.9	22.8	82.7
1	4	14	56.0	24.1	80.1
1	4	21	51.4	27.5	79.0
1	4	28	49.7	27.7	77.4
1	25	0.92	61.9	21.0	82.9
1	25	4	49.8	28.6	78.4
1	25	5	48.0	30.7	78.6
1	25	14	37.4	32.3	69.7
1	25	21	34.4	28.9	63.3
1	25	28	31.4	27.1	58.5
5	n/a	0	62.1	20.3	82.4
5	4	0.92	60.9	18.9	79.9
5	4	4	57.1	22.3	79.3
5	4	5	55.3	20.6	76.0
5	4	14	54.3	22.2	76.5
5	4	21	49.8	24.8	74.6
5	4	28	47.6	26.3	73.9
5	25	0.92	57.2	22.0	79.2
5	25	4	51.0	25.4	76.4
5	25	5	46.2	29.8	76.0
5	25	14	37.8	28.7	66.5
5	25	21	33.7	27.2	60.9
5	25	28	31.6	25.3	56.9

[0550] 将表18中所列出的全部RP-HPLC样品冷冻在-80°C直至分析。天然rCSP不含有焦谷氨酸盐。pE-CSP是焦谷氨酸种类。

[0551] 表19.pH 7.0的液体制剂(533-550)在4°C和25°C及1mg/ml和5mg/ml的rCSP至最多21天的RP-HPLC相对面积。

[0552]

制剂的 rCSP 浓度(mg/mL)	保持温度(°C)	保持为液体的时间(天)	%面积原始 rCSP	%面积 pE-rCSP	总 rCSP(%面积原始 rCSP+%面积 pE-rCSP)
1	n/a	0	62.8	20.1	82.9
1	4	3	63.3	20.9	84.2
1	4	5	62.3	21.9	84.1
1	4	14	60.6	21.9	82.5
1	4	21	58.0	23.3	81.3
1	25	3	55.0	26.5	81.4
1	25	5	49.8	30.5	80.2
1	25	14	39.9	34.7	74.6
1	25	21	无数据	无数据	无数据
5	n/a	0	62.3	19.2	81.4
5	4	3	62.8	18.8	81.6
5	4	5	59.4	19.1	78.5
5	4	14	56.6	22.6	79.2
5	4	21	54.7	23.9	78.6
5	25	3	53.7	25.7	79.4
5	25	5	50.3	27.6	77.8
5	25	14	36.1	29.0	65.1
5	25	21	无数据	无数据	无数据

[0553] 在表19中所列出的全部RP-HPLC样品被冷冻在-80°C直至分析。

[0554] 表20.pH 6.4液体制剂(533-551)在4°C和25°C下对于1mg/ml和5mg/ml的rCSP浓度至最多28天的RP-HPLC相对面积。

[0555]

制剂的 rCSP 浓度(mg/mL)	保持温度(°C)	保持为液体的时间(天)	%面积原始 rCSP	%面积 pE-rCSP	总 rCSP(%面积原始 rCSP+%面积 pE-rCSP)
1	n/a	0	64.5	18.8	83.3
1	4	1	61.2	20.3	81.5
1	4	2	62.3	20.5	82.7
1	4	6	61.9	20.3	82.2
1	4	15	62.1	20.3	82.4
1	4	23	60.3	21.3	81.6
1	4	28	49.7	27.7	77.4
1	25	1	60.7	23.3	84.0

[0556]

1	25	2	58.4	24.5	82.8
1	25	6	51.2	29.4	80.6
1	25	15	36.8	39.5	76.4
1	25	23	35.3	37.4	72.7
5	n/a	0	63.3	18.1	81.4
5	4	1	62.7	20.8	83.5
5	4	2	62.7	19.5	82.2
5	4	6	63.4	18.3	81.8
5	4	15	60.2	20.4	80.6
5	4	23	56.3	22.8	79.2
5	4	28	47.6	26.3	73.9
5	25	1	60.9	21.7	82.6
5	25	2	60.8	20.4	81.2
5	25	6	51.5	26.8	78.3
5	25	15	35.2	37.2	72.4
5	25	23	32.7	27.8	60.5

[0557] 在表20中所列出的所有RP-HPLC样品被冷冻在-80℃直至分析。

[0558] 表21.1mg/mL的rCSP液体制剂(533-549-550-551)在4℃和25℃及pH6.4、7.0、7.5下最多28天的SE-HPLC相对单体面积。

[0559]

制剂的 rCSP 浓度(mg/mL)	制剂的 rCSP pH	保持温度(℃)	保持为液体 的时间(天)	%单体面积 rCSP
1	6.4	-80	0	90.4
1	7.0	-80	0	90.4
1	7.5	-80	0	89.0
1	6.4	4	1	89.5
1	6.4	4	2	90.7
1	6.4	4	6	88.4
1	6.4	4	15	88.3
1	6.4	4	23	87.1
1	7.0	4	3	90.0
1	7.0	4	5	90.7
1	7.0	4	14	90.1
1	7.0	4	21	88.0
1	7.5	4	1	88.2
1	7.5	4	4	88.7
1	7.5	4	5	87.3
1	7.5	4	14	89.6
1	7.5	4	21	87.7
1	7.5	4	28	83.5



[0560]

1	6.4	25	0	87.8
1	6.4	25	1	88.8
1	6.4	25	2	85.5
1	6.4	25	6	85.3
1	6.4	25	15	82.0
1	6.4	25	23	80.9
1	7.0	25	0	90.0
1	7.0	25	3	89.4
1	7.0	25	5	89.6
1	7.0	25	14	87.0
1	7.0	25	21	83.1
1	7.5	25	1	89.2
1	7.5	25	4	87.8
1	7.5	25	5	82.9
1	7.5	25	14	75.8
1	7.5	25	21	69.9
1	7.5	25	28	62.5

[0561] 在表21中斜体字所列出的样品本在0天被冷冻在-80℃。所有其他样品被保持液态(未冷冻)直到分析的时间。

[0562] 表22.5mg/mL rCSP的液体制剂(533-549-550-551)在4℃和25℃及pH6.4、7.0、7.5下最多28天的SE-HPLC相对单体面积。

[0563]

制剂的 rCSP 浓度(mg/mL)	制剂的 rCSP pH	保持温度(℃)	保持为液体 的时间(天)	%单体面积 rCSP
5	6.4	-80	0	90.0
5	7.0	-80	0	91.0
5	7.5	-80	0	89.0
5	6.4	4	1	89.8
5	6.4	4	2	90.1
5	6.4	4	6	87.6
5	6.4	4	15	86.8
5	6.4	4	23	86.4
5	7.0	4	3	88.3
5	7.0	4	5	87.5
5	7.0	4	14	90.2

[0564]

5	7.0	4	21	87.7
5	7.5	4	1	88.7
5	7.5	4	4	87.2
5	7.5	4	5	87.0
5	7.5	4	14	87.5
5	7.5	4	21	84.9
5	7.5	4	28	88.7
5	6.4	25	0	90.1
5	6.4	25	1	88.8
5	6.4	25	2	87.5
5	6.4	25	6	86.8
5	6.4	25	15	84.2
5	6.4	25	23	79.4
5	6.4	25	28	60.3
5	7.0	25	0	90.1
5	7.0	25	3	87.0
5	7.0	25	5	86.9
5	7.0	25	14	82.5
5	7.0	25	21	81.4
5	7.5	25	1	86.3
5	7.5	25	4	85.1
5	7.5	25	5	84.4
5	7.5	25	14	70.3
5	7.5	25	21	66.5
5	7.5	25	28	60.3

[0565] 在表22中斜体字所列出的样品在0天被冷冻在-80℃。所有其他样品被保持液态(未冷冻)直到分析的时间。

[0566] 进行稳定性研究,其中通过使用额外的疏水相互作用色谱步骤(例如,如本文在实施例9中所描述的)降低了在rCSP制剂中的宿主细胞蛋白质的水平。在120小时后,在2-8℃下观察到通过RP-HPLC在稳定制剂缓冲液中检测的总rCSP高达91.4%(见表23和24),代表了0.2%RDP。在这些研究中,在3、6、16、24、48、72、96和120小时在-80℃、2-8、25和40℃下评

估PBS, pH 6.7中1mM的MTG和0.5M精氨酸中的两个批次rCSP (批次533-616和533-618)。

[0567] 如本文中所述的进行反相HPLC。在样品分析之前,通过以1mL/分钟的速率使30mL流动相A流过对柱条件化。在与评估可重复性和保留时间的样品相同的浓度和注射体积下分析30 $\mu$ g的rCSP参考标准(在PBS中,0.5M精氨酸-HCl,1mM的单硫代甘油,pH 7.0)注射。进行仅包含稀释缓冲液(PBS,0.5M精氨酸-HCl,1mM的单硫代甘油,pH 7.0)的空白注射用于系统适用性评估。一式三份注射大批药物物质样品。流动相B的梯度为22%至32%,在20分钟内。在214nm和280nm监测样品标准和空白,并产生面积报告。峰的面积被用来测定rCSP的质量和纯度。RP分析跟踪CSP(原始-CSP和焦谷氨酸-CSP)的含量和3个峰组1-3。

[0568] 对于每个数据点(时间/存储条件)的重复平均值示于表23和24中。在对照和其对应的加压样品的离散的、时间点特异性运行中分析样品批次。通过色谱面积和纯度(面积%)通过产物之间的RPD(相对百分差)追踪产物的改变/降解。

[0569] 表23. 批次533-616结果

[0570]

批次	类型	处理 °C/%RH	时间 小时	F/T 循环	对照 小时	面积				色谱纯度(面积%)			
						n-CSP	p-CSP	总 CSP	% RDP CSP	n-CSP	p-CSP	总 CSP	% RDP CSP
616	对照	-80	0	2		24133	6493	30326		72.1	19.4	91.5	
		-80	0	5		24166	6297	30463		72.4	18.9	91.3	
		-80	0		0,3	23981	6199	30180		72.4	18.7	91.1	
		-80	0		6	23994	6121	30115		72.2	18.4	90.7	
		-80	0		16	24143	6309	30452		71.1	18.6	89.7	
		-80	0		24	23362	6165	29526		72.1	19.0	91.1	
		-80	0		48	24143	6293	30437		72.5	18.9	91.4	
		-80	0		72	24158	6505	30663		71.3	19.2	90.5	
		-80	0		96	24453	6381	30835		72.5	18.9	91.5	
		-80	0		120	24175	6165	30340		72.7	18.5	91.2	
616	测试	2-8	3			24414	6361	30775	2.0	72.6	18.9	91.6	0.5
		2-8	6			23791	6401	30192	0.3	71.7	19.3	91.1	0.4
		2-8	16			24306	6245	30551	0.3	72.6	18.6	91.2	1.7
		2-8	24			24412	6251	30663	3.8	72.7	18.6	91.4	0.2
		2-8	48			23810	6434	30244	-0.6	72.2	19.5	91.7	0.3
		2-8	72			24244	6621	30866	0.7	71.9	19.6	91.5	1.1
		2-8	96			23924	6598	30522	-1.0	71.6	19.8	91.4	-0.1

[0571]

		2-8	120			23592	6600	30192	-0.5	71.4	20.0	91.4	0.2
616	测试	25/60	3			23844	6555	30399	0.7	71.6	19.7	91.3	0.2
		25/60	6			24223	6153	30376	0.9	72.2	18.3	90.6	-0.1
		25/60	16			23077	6558	29635	-2.7	70.0	19.9	89.9	0.2
		25/60	24			22885	7004	29888	1.2	69.5	21.3	90.8	-0.4
		25/60	48			21672	7641	29313	-3.7	65.6	23.1	88.8	-2.9
		25/60	72			20409	7738	28147	-8.2	64.7	24.5	89.2	-1.5
		25/60	96			19231	8349	27580	-10.6	61.6	26.8	88.4	-3.4
		25/60	120			17394	10289	27682	-8.8	53.8	31.8	85.6	-6.2
616	测试	40/75	3			23428	6644	30072	-0.4	69.7	19.8	89.5	-1.8
		40/75	6			22644	6835	29479	-2.1	68.5	20.7	89.2	-1.6
		40/75	16			19710	8535	28246	-7.2	61.2	26.5	87.7	-2.3
		40/75	24			17924	9857	27781	-5.9	56.2	30.9	87.2	-4.4
		40/75	48			13677	11544	25221	-17.1	45.1	38.1	83.2	-9.0
		40/75	72			22717	0	22717	-25.9	78.1	0.0	78.1	-13.7
		40/75	96			20597	0	20597	-33.2	76.8	0.0	76.8	-16.1
		40/75	120			7648	11614	19262	-36.5	28.4	43.2	71.6	-21.5

[0572] F/T=冷冻/解冻;CONTRL=对照;面积=峰下面积;%RDP=与对照相比,产物中的百分相对差异;n-CSP=原始CSP;p-CSP=焦谷氨酸CSP;总CSP=n-CSP+p-CSP;RH=相对湿度。

[0573] 表24.批次533-618结果

[0574]

批次	类型	处理	时间	F/T	对照	面积			色谱纯度(面积%)				
		°C/%RH	小时	相循环	小时	n-CSP	p-CSP	总CSP	%RDP CSP	n-CS P	p-CS P	总CSP	%RDP CSP
618	对照	-80	0	2		22283	5435	27719		72.0	17.6	89.5	
		-80	0	5		22407	5458	27845		70.9	17.2	88.1	
		-80	0	0,3		22495	5309	27804		72.3	17.1	89.4	
		-80	0	6		22622	5075	27697		72.5	16.3	88.7	
		-80	0	16		22429	5238	27666		71.2	16.6	87.8	
		-80	0	24		22443	5250	27693		71.9	16.8	88.7	
		-80	0	48		22864	5203	28066		72.6	16.5	89.1	
		-80	0	72		22794	5194	27988		71.9	16.4	88.3	
		-80	0	96		22640	5360	28001		71.7	17.0	88.7	
		-80	0	120		22010	5462	27473		71.1	17.7	88.8	
618	测试	2-8	3			22317	5228	27545	-0.9	72.4	17.0	89.4	0.0
		2-8	6			22621	5267	27889	0.7	71.9	16.7	88.6	-0.1
		2-8	16			21956	5258	27214	-1.6	70.4	16.9	87.3	-0.6
		2-8	24			22149	5397	27546	-0.5	71.2	17.3	88.5	-0.2
		2-8	48			20948	5048	25996	-7.4	71.8	17.3	89.1	0.0
		2-8	72			22256	5437	27693	-1.1	71.1	17.4	88.5	0.2
		2-8	96			22286	5274	27560	-1.6	71.7	17.0	88.7	0.0
		2-8	120			21820	5320	27139	-1.2	71.4	17.4	88.8	0.0
618	测试	25/60	3			22772	5210	27982	0.6	72.7	16.6	89.3	0.0

[0575]

		25/60	6			22348	5193	27541	-0.6	71.8	16.7	88.5	-0.3
		25/60	16			21791	5580	27370	-1.1	68.9	17.6	86.6	-1.4
		25/60	24			21234	6257	27490	-0.7	68.7	20.2	89.0	0.3
		25/60	48			20310	6193	26504	-5.6	67.7	20.6	88.3	-0.9
		25/60	72			19044	7110	26154	-6.6	63.7	23.8	87.5	-0.8
		25/60	96			18429	7233	25662	-8.4	62.4	24.5	86.9	-2.0
		25/60	120			17665	7456	25121	-8.6	60.7	25.6	86.3	-2.8
618	测试	40/75	3			21845	5735	27580	-0.8	69.8	18.3	88.2	-1.3
		40/75	6			21621	6078	27699	0.0	68.6	19.3	87.9	-1.0
		40/75	16			19195	7261	26456	-4.4	61.8	23.4	85.2	-3.0
		40/75	24			16950	9159	26109	-5.7	55.3	29.9	85.2	-3.9
		40/75	48			12606	12211	24817	-11.6	41.7	40.4	82.2	-7.8
		40/75	72			11107	12116	23223	-17.0	37.8	41.2	79.0	-10.5
		40/75	96			8727	12874	21601	-22.9	30.6	45.1	75.7	-14.6
		40/75	120			7460	12164	19624	-28.6	27.6	45.1	72.7	-18.2

[0576] F/T=冷冻/解冻;CTRL=对照;面积=峰下面积;%RDP=与对照相比,产物中的百分相对差异;n-CSP=原始CSP;p-CSP=焦谷氨酸CSP;总CSP=n-CSP+p-CSP;RH=相对湿度。

[0577] 制作批次特异性图表以描述色谱纯度(相对每存储状态的时间)和降解率的线性(阿伦尼乌斯(Arrhenius)图)。基于两个批次的相对变化(纯度或总%rCSP的相对百分差异),观察到产物在4℃持续5天是稳定的(<2%纯度损失)。在25℃相同的时间发生高达6%的纯度损失。通过24小时的降解曲线内插,预测产物在40℃发生了显著降解(5%)。用于三个处理条件(温度)中降解动力学速率的阿伦尼乌斯曲线( $r=-0.996$ )表明单一的速率限制过程。各个批次的图一致,表明批次之间的降解相似性。

[0578] 结论

[0579] 稳定性研究表明,当在含有1mM单硫代甘油和0.5M精氨酸的PBS的赋形剂缓冲液中保持在pH 6.4-7.0下时,如本文所述产生的重组CSP制剂在4℃下保持>85%的单体含量高达23天。在PBS中,1mM的MTG,由80%单体组成的10%精氨酸缓冲的rCSP在浓缩至5mg/ml后4℃下保持16小时,而在4℃下16小时之后在单独的PBS中的浓缩样品含有29%的单体。通过RP-HPLC和SE-HPLC分析,在pH 7.5的缓冲液中的rCSP在几乎所有的时间点显示比在pH 6.4或7.0的缓冲液中的rCSP更低的稳定性。

[0580] 使用其它的稳定性研究在上述结果基础上证实和改进,显示出约10%总rCSP的增加。通过使用疏水相互作用色谱减少了用于这些研究的rCSP制剂中的宿主细胞蛋白质。

[0581] 实施例8:工程运行

[0582] 进行4个工程运行以测试将实施例3中所述的方法放大至更大的量。

[0583] 通过用所选择菌株的冷冻培养原液接种含有600ml的补充酵母提取物和甘油的化学成分确定的培养基的摇瓶而产生用于发酵罐培养的接种物。在32℃振荡下经过约21小时的孵育后,将摇瓶培养物无菌转移到20升的生物反应器(New Brunswick Scientific,IF-20L),其含有被设计用于支持高生物质的化学成分确定的培养基。通过调节压缩大气的喷射流以及搅拌速率,将液体培养基中的溶解氧维持在正水平。通过加入氨水将pH控制在所需的设定点。分批补料高细胞密度发酵过程分为初始生长阶段,接着是基因表达(诱导)阶

段,其中加入0.38克的IPTG(对于基于诱导时估计的8升体积,培养液中0.2mM的浓度)来开始重组基因表达。使细胞在27-32°C在pH 6.85至7.2下生长。然后将发酵的诱导阶段进行24小时。在此阶段中的时间点,从发酵罐中抽取样品来测定细胞密度且然后将100 $\mu$ L的等份试样冷冻在-20°C下用于以后目标基因表达的测定。在24小时的最终时间点,通过以15900 $\times$ g离心(Beckman Coulter,Avanti J-20)90分钟,将整个发酵培养基(对于每个20升生物反应器约10升)收获在1L等份中。将细胞糊冷冻在-80°C。对于所有四个运行,先前冷冻的细胞糊在2M尿素,20mM tris,pH 8.0中,以20%的浓度(细胞糊/升溶液)中解冻,再悬浮成均质的溶液和微流化。

[0584] 工程运行1:在此运行中,对新鲜(未事先冷冻)的裂解物进行TMAE。收获后,微流化、盘栈离心和0.2微米过滤,将9.9克粗rCSP回收,且来自20%的细胞裂解物的总体产率为81%。如通过SDS-CGE所测定的,以0.31mg/ml的浓度和7%的纯度将10g的CSP加载到TMAE柱上。3g的CSP蛋白质以0.05mg/ml的浓度和40%的纯度洗脱。

[0585] 对TMAE洗脱物进行陶瓷羟磷灰石(CHA)上的精制色谱。加载至CHA柱上的TMAE洗脱物的纯度为45%和通过SDS-CGE的CHA洗脱物的纯度为75%。CHA洗脱物的浓度为0.04mg/ml(来自0.05ng/ml的TMAE洗脱物)。产率是81%,都在洗脱物中。所计算的CSP余量为96%(CSP的剩余部分(未收集在洗脱物中)可以归入洗脱物之外的级分中)。

[0586] 通过SDS-PAGE,从工程运行1的TMAE柱的回收率是27%。进行研究以确定与以上实施例3中所述的(10升)运行相比在此运行得到的低产率和材料的纯度的原因。

[0587] 树脂(条件化的与新的树脂)、树脂加载、裂解物浆(来自成功运行-通过的经证明的浆与工程运行1的浆)、导电性、树脂加载和线性流速(停留时间)结合,和来自成功运行的全部条件的重复,包括使用冷冻的裂解物。

[0588] 新鲜的裂解物和冷冻/解冻的裂解物样品的SDS-CGE显示在所有新鲜的裂解物样品中主rCSP带上的高分子量条带“梯状条带”。展现梯状条带的所有溶解物样品在TMAE上给出不可接受的收率和纯度。被解冻并立即通过电泳分析的冷冻样品也显示梯状;然而,被解冻并在分析之前被保持在室温下6小时的冷冻样品没有显示出梯状条带。评估过滤和冷冻后保持时间对梯状条带的影响。发现过滤对梯状条带无显著影响,而6小时冷冻后的保持时间显著降低梯状条带(图32)。对1小时、3小时、6小时、7.5小时和14小时的冷冻/解冻后保持时间进行评估。发现在相同的保留时间下,溶解在4M尿素中的样品比在2M尿素中的样品表现出显著较少的梯状条带。另外,保持时间增加长达6小时直接减少在2M和4M尿素的样品中的梯状条带;超过6小时后,在4M尿素样品中保持时间没有表现出对梯状条带的可见的影响,但在2M尿素样品中减少了梯状条带。

[0589] 总之,被加载到TMAE柱上的样品中存在聚集体(如由SDS-CGE中高MW条带的“梯状条带”所证明的)与差的阴离子交换色谱结果之间测量到很强的相关性。一旦消除多种可能的处理变量,冷冻和解冻后的保持时间被确定为影响裂解物样品中的聚集体检测的主要参数。该结果提示,冷冻和解冻后六小时保持时间将显著地减少聚集体形成。排除被评估的其他因素-传导性、树脂加载、线性流速、在工程运行和处理运行之间的细胞糊的差异以及树脂是否为新的或条件化的-作为较差阴离子交换色谱结果的原因。

[0590] 工程运行2:在此运行中,进行了深度过滤和TMAE色谱之间裂解物的带有6小时保持时间的冷冻/解冻循环,具有良好的效果。深度过滤后通过Q-PAGE测定的初级回收率为

12.8g的rCSP;从20%的细胞裂解物的总产率为91%。如经SDS-CGE测量的,浓度为0.30mg/ml和纯度为5%的裂解物载入阴离子交换捕获柱中。rCSP以0.58mg/ml的浓度和78%的纯度被洗脱。TMAE柱显示出一些结垢的迹象,但性能并没有受到影响。在所加载的没有过滤的裂解物中检测到沉淀。以0.2微米过滤TMAE洗脱物和通过CHT将滤液进行精制色谱。TMAE洗脱物经过0.2微米过滤后的HA(CHT)加载的纯度为82%。CHT洗脱物纯度为97%,浓度为0.75mg/ml,并且产率是113%,如通过SDS-CGE所测量的。

[0591] 在CHT洗脱物(533-511)的0.2微米过滤和RT保持12小时后,通过DTT进行轻度还原(533-512)。将10mM的DTT掺入过滤的洗脱物中至20 $\mu$ M的终浓度。然后用蠕动泵(16.6L的CHT洗脱物,袋中0.72g/L的CSP)将洗脱物在20L袋中以1.5-2.5升/分钟再循环19小时。这一步的回收率是102%。还原前和后的CHT洗脱物的尺寸排阻HPLC色谱分析显示单体含量明显增加,从85%到100%。

[0592] 在轻度还原的材料上进行通过切向流过滤(TFF)的缓冲液交换以除去盐、尿素和DTT。用1 $\times$ PBS渗滤CSP单体。5kDa分子量截留,0.1平方米再生纤维素膜被用来保留CSP。缓冲液交换步骤的回收率为86.2%,使7.3%的CSP在渗透物中和0.4%在系统内的滞留体积中。对最终产物的分析表明在A280下0.66g/L,10.3EU/ml的内毒素水平,通过HCP-ELISA的4700ppm的宿主细胞蛋白质,和通过SDS-CGE的97%纯度。LC/MS显示5.1%的rCSP是N-末端剪切的。RP-HPLC保留时间与CSP标准相一致。UF/DF之后回收10.6g的CSP并将其冷冻在-80 $^{\circ}$ C。与对照(533-407)相比,UF/DF后大批药物物质(533-513)的尺寸排阻色谱显示出此步骤中较低的rCSP二聚化和聚集水平,导致该含量为90%单体,7%的二聚体,和3%的聚集体。

[0593] 该运行确认,使用所描述的发酵和整合的纯化方法可以大规模制备符合纯度、产率、浓度、单体含量、剪切和内毒素的目标水平的纯化rCSP。

[0594] 工程运行3:在该运行中,按照与工程运行2相同的方案进行收获、细胞破碎以及裂解物的澄清。在加载到TMAE柱前,将裂解物保持在-80 $^{\circ}$ C下6小时,并在室温下保持6小时,但观察到不完全的裂解物冷冻。深度过滤后通过Q-PAGE测定的初级回收率为14.8g的CSP,和从20%的细胞裂解物的总体产率为98%。在解冻的裂解物中观察到重的沉淀和在装载过程中早期观察到重的柱结垢并随着运行过程变得越来越重。工程运行3的纯度和产率比工程运行2显著降低。通过SDS-CGE,ER3的rCSP余量为41%,在洗脱物中为23%,在洗液中为4%和在流通液中为13%。没有进行精制色谱和缓冲液交换。

[0595] 工程运行4:在此运行中,按照与工程运行2相同的方案进行收获、细胞破碎以及裂解物的澄清,但将低温缓冲液用于TMAE色谱。

[0596] 深度过滤后通过定量SDS-PAGE(Q-PAGE)测定的初级回收率为13.7g的CSP;从20%的细胞裂解物的总体产率为81%。解冻后,观察到沉淀和在加载到TMAE柱前通过0.45微米过滤将裂解物过滤。没有观察到柱的结垢。在此柱运行中使用的缓冲液在使用时是6-12 $^{\circ}$ C。纯度为通过SDS-CGE为65%。加载的裂解物的浓度为0.34ng/ml和对于洗脱是0.24ng/mL。洗脱中的产率是54%,洗涤液中是4%,在流通液中是1%,和在条中是3%。CSP的质量平衡为62%。这些结果比工程运行2显著降低,且被认为是使用低温缓冲液引起的。

[0597] 在CHT上进行精制色谱。通过SDS-CGE,加载的TMAE洗脱物为65%纯度,和CHT洗脱纯度为94%。加载的材料浓度为0.25mg/ml;洗脱为0.27mg/ml。通过SDS-CGE的产率是112%,使所有蛋白质到洗脱中。回收7.2克CHT洗脱物并储存在-80 $^{\circ}$ C。引起纯度比ER2略低

的最可能的原因是可能降低的TMAE洗脱物浓度和纯度。

[0598] 结论

[0599] 发酵和纯化方法成功地产生达到或超过纯度、产率、单体含量、N末端剪切以及内毒素的目标值的多克的rCSP量。工程运行2产生10.6克的纯化CSP大批药物物质。工程运行4产生7.2克CHT洗脱物。通过HPLC-SEC和RP-HPLC,由这两种工程运行产生的材料的纯度符合目标值。在较大的运行中观察到的沉淀可能是由于较大的裂解物冷冻所需的额外时间,这可能会导致某些部分的裂解物未冷冻,或导致解聚所需的较短冷冻时间。

[0600] 实施例9:宿主细胞蛋白质去除方法

[0601] 开发了用于进一步消除宿主细胞蛋白质的方法。为了在第三色谱步骤中用来减少大批药物物质中宿主细胞蛋白质的量,评估两种尺寸排阻树脂和5种疏水性相互作用树脂。发现使用Toyo己基-650C的疏水性相互作用色谱将宿主细胞蛋白质减少至少于100ppm,具有优良的rCSP纯度、浓度、产率和完整质量。在轻度还原条件中使用MTG进一步提高了产量。

[0602] 进行利用改进的工艺过程的全规模工程运行,包括4.56L的己基-650C第三色谱步骤。该运行在最终赋形剂缓冲剂中产生7.6克大批药物物质,如在实施例7中所描述的,具有96.3%的单体含量和152ppm的宿主细胞蛋白质。

[0603] 去除宿主细胞蛋白质的方法的评估

[0604] 评估用于减少HCP的分析分离方法。用SE-HPLC从HCP去除rCSP和收集(微分解的)用于通过SDS-PAGE和HCP-ELISA的分析。对533-407(用实施例2中描述的方法从菌株533-129制备的内部rCSP参考标准)的SE-HPLC分析显示,通过ELISA在主SE-HPLC级分中的HCP水平显著降低:对于SE-HPLC峰的350ppm与预SE-HPLC的4100ppm。当通过SDS-PAGE分析时,SE-HPLC后在来自533-407的主rCSP峰样品中没有明显HCP带。

[0605] 评估用于减少HCP的制备型疏水相互作用色谱

[0606] 评估己基650C、苯基HP、丁基HP和PPG 600M用于通过疏水性相互作用色谱(HIC)的第三柱纯化。测试的疏水作用树脂的相对结合强度和保留时间从最强(最长保留)到最弱(最短保留)是:己基650C>丁基HP>苯基HP>PPG 600M。使用5.13mL柱对所有测试的树脂进行实验室规模运行。对用MTG(533-565和533-563)和DTT(533-523)还原的CHT洗脱物样品进行了比较,使用从1.0M至0M硫酸铵的20CV洗脱梯度。使用配备Frac-950级分收集器的ÄKTAexplorer100色谱系统(GE Healthcare)进行快速蛋白液相色谱(FPLC)操作。使用的材料:Tosoh树脂己基650C(批号65HECB501N0);HEPES酸(目录号4018-06, JTBaker, Phillipsburg, NJ);Hepes钠盐(目录号4153-05, JT Baker, Phillipsburg, NJ);氯化钠(目录号13423, Sigma/Riedel de Haen, St. Louis, MO);硫酸铵(目录号BDH8001-12Kg, BDH);尿素(目录号4203-60, JT Baker, Phillipsburg, NJ);单硫代甘油(MP Biomedicals目录号155727);己基-650C和PPG 600M(目录号21399, Tosoh USA, Flemington, NJ, GE Healthcare, Piscataway, NJ);苯基HP(GE, 17-5195-01);丁基HP(GE, 28-4110-01)。

[0607] 在对于第三柱测试的柱树脂中,己基650-C产生最低水平的HCP(<100ppm)以及低N-末端剪切和高水平的纯度、产率以及单体与二聚体的分离。使用112.5ml柱在中等规模优化己基-650C,以提供在大得多的制造规模下的充分性能预测。色谱参数显示于表25中。

[0608] 表25. 用于整合纯化运行的色谱参数



[0609]

柱	柱大小	运行条件
<p><u>己基</u> <u>650C</u> (TOSOH)  分步洗脱</p>	<p>己基-650C_0.66 cm 直径 ×15 cm 高度  体积: 5.13 mL</p>	<p><u>载量</u>: 还原的 CHT 洗脱物调节至含有 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG, 在 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵; pH 7.5 中</p> <p><u>调节缓冲液</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 3 M 硫酸铵+1 mM MTG; pH 7.5</p> <p><u>Pre eq</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG pH 7.5</p> <p><u>平衡缓冲液(EQ)</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG; pH 7.5</p> <p><u>分步洗脱缓冲液</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+100 mM 硫酸铵+1 mM MTG; pH 7.5</p> <p><u>洗涤 2</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG; pH 7.5</p>
<p><u>己基</u> <u>650C</u> - (TOSOH)  <u>15 CV 梯度</u></p>	<p>己基-650C_0.66 cm 直径 ×15 cm 高度  体积: 5.13 mL</p>	<p><u>载量</u>: 还原的 CHT 洗脱物在 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5 中</p> <p><u>调节缓冲液</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 3 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5</p> <p><u>Pre eq</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG pH 7.5</p> <p><u>平衡缓冲液(EQ)</u>: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5</p>

[0610]

		洗脱: 线性梯度洗脱, 15 CV 的 0-100% B (20 mM Hepes, 2 M 尿素 +1 mM MTG pH 7.5), 和 100% B 的 3 CV
<b><u>己基</u></b> <b><u>650C</u></b>  <b><u>(TOSOH)</u></b>  <b><u>15 CV 梯</u></b> <b><u>度</u></b>	己基-650C_3.2 cm 直径 ×14 cm 高度  体积: 112.5 mL	载量: 还原的 CHT 洗脱物在 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5 中 调节缓冲液: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 3 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5 Pre eq: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG pH 7.5 平衡缓冲液(EQ): 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5 洗脱: 线性梯度洗脱, 15 CV 的 0-100% B (20 mM Hepes, 2 M 尿素 +1 mM MTG pH 7.5) 和 100% B 的 3 CV
<b><u>己基</u></b> <b><u>650C</u></b>  <b><u>(TOSOH)</u></b>  <b><u>15 CV 梯</u></b> <b><u>度</u></b>	己基-650C_20 cm 直径 ×14.5 cm 高度  体积: 4.56L	载量: 还原的 CHT 洗脱物调节至含有 0.5 M 硫酸铵, pH 7.5+1 mM MTG 调节缓冲液: 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 3 M 硫酸铵+1 mM MTG pH 7.5 Pre eq 缓冲液: 20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG pH 7.5 平衡缓冲液(EQ): 20 mM Hepes, 2 M 尿素, 0.5 M 硫酸铵+ 1 mM MTG pH 7.5. 洗脱: 线性梯度洗脱, 15 CV 的 0-100% B(20 mM Hepes, 2 M 尿素+1 mM MTG pH 7.5) 和 100% B 的 3 CV.

[0611] 实验室规模的己基-650C运行

[0612] 1. 实验室规模的己基-650C运行: 具有MTG的1.0M到0M硫酸铵梯度(533-597和533-594)

[0613] 用1mM的MTG-还原的CHT洗脱物(533-565)运行Toyo-己基650-C柱(0.66厘米直径×15厘米高度),并用1M至0M硫酸铵与1mM的MTG的15柱体积(CV)梯度洗脱,随后在0M硫酸铵与1mM的MTG下的3CV。柱洗脱物被命名为533-597。对洗脱的级分进行SDS-CGE和通过HCP-ELISA测定HCP水平。洗脱峰的早期级分比后来的级分显示出更高的HCP水平,而所有级分都远低于100ppm。一些rCSP单体和几乎所有的二聚体被洗脱在柱水条(column water strip)中。加载用于533-597的相同样品材料(CHT洗脱物533-565)以得到洗脱物533-594并在相同条件下洗脱。533-594的SDS-CGE分析表明,刚好在峰rCSP级分前洗脱的级分显示出双重条带,表明HCP的存在,而峰rCSP洗脱级分并没有在SDS-CGE上显示出双重条带。最显著地,如通过ELISA所测量的,峰级分中HCP的量为50ppm。所选择级分的电泳图显示在邻近洗脱范围的中心的那级馏分中的单峰。通过533-594的RP-HPLC的分析显示,在SDS-CGE中显示两个条带的F2级分富集在在主CSP峰之前洗脱的第2组杂质。主CSP峰的拖尾肩(被指定为“级分#2”(见实施例7))包含具有与N-末端焦谷氨酸一致的完整质量测量的rCSP种类。洗脱级分7,邻近洗脱峰的中心,显示出非常少的焦谷氨酸-CSP;级分F12,也靠近峰的中心,显示更多的焦谷氨酸-CSP和比F7少的第2组杂质。柱条含有比洗脱梯度的任何部分更大量的pE-CSP和第3组二聚体。表26比较了己基650-C洗脱峰533-594级分的RP-HPLC运行,显示出在级分中3RP峰组的相对富集。在样品列中显示了所分析的级分。组1、2和3的峰如实施例7中描述的。通过LC/MS的完整质量分析在还原的己基G2级分中测定2%的剪切。

[0614] 表26. Toyo己基-650C洗脱物级分(533-594)的反相-HPLC分析

[0615]

样品	面积%				
	组 1	组 2	组 3	原始 CSP	总 CSP
533-594 e12	0.0	71.9	2.3	19.2	25.8
533-594 f1	0.0	68.8	1.9	22.8	29.3
533-594 f3	4.9	51.1	1.1	36.2	42.9
533-594 f7	5.7	14.3	1.6	69.3	78.3
533-594 f12	3.8	5.2	2.1	72.7	88.9
533-594 g2	2.6	4.2	3.7	69.8	89.5
533-594 g5	2.1	3.7	2.9	65.0	91.4
533-595 条	0.0	3.3	10.4	56.6	86.3
533-565 对照	3.0	10.7	6.6	57.4	79.7

[0616] 2. 实验室规模的己基-650C运行: 0.5M至0M硫酸铵梯度与MTG和分步洗脱

[0617] 进一步的梯度洗脱的己基650-C柱运行3-6利用0.5M到0M硫酸铵的洗脱梯度。较窄梯度范围允许在rCSP洗脱范围内更好的分辨率。运行3&4在用0.5M至0M硫酸铵梯度洗脱的

柱上对比用1mM的MTG (533-606) 还原的CHT洗脱物与用100mM DTT (533-610) 还原的那些。单个洗脱物级分和来自533-610的级分池的HCP水平的比较显示洗脱峰附近的较高HCP浓度，但与加载的材料 (533-523) 中7000ppm相比，低得多的约900ppm的HCP水平。加载材料中的剪切为15%，而已基洗脱物 (级分E2-F2) 的主峰级分的剪切为6.2%。运行5和6各使用0.1M硫酸铵与经MTG (533-607和533-611) 还原的CHT洗脱物的3CV分步洗脱。SDS-CGE分析表明，梯度洗脱比分步洗脱实现显著更好的单体与二聚体和HCP的分离。表27示出了来自这些柱运行的分析数据。用533-606获得了最低的HCP水平以及低剪切和高纯度；因此，选择1mM的MTG的还原接着用0.5至0M硫酸铵梯度的己基-650C色谱用于后续的中等和全规模运行。

[0618] 中等规模的己基-650C运行 (533-615) 和大批药物物质 (533-616)

[0619] 根据从实验室规模己基梯度柱获得的结果，向具有112.6ml柱体积的大型己基650-C制备柱载入MTG-还原的CHT洗脱物 (533-563)，并用0.5M到0M的硫酸铵梯度洗脱；洗脱物命名为533-615 (运行7)。通过ELISA来自533-615的HCP为152ppm和rCSP的纯度为99.2%。表27中概括了对于533-615以及533-606, -610, -607和-611的通过SDS-CGE的纯度的数据，通过在280nm吸光度的总蛋白质浓度，通过LC/MS的氨基酸剪切和通过ELISA的宿主细胞蛋白水平。如通过反相HPLC测定的总rCSP (天然加焦谷氨酸形式) 从CHT后的82.4%增加到己基650C后的91.5%。

[0620] 表27. 己基纯化前和后的分析数据

实验方案号		533-606 15CV 梯度	533-610 15CV 梯度	533-607 分步洗脱	533-611 分步洗脱	533-615 15CV 梯度
加载的样品		533-563	533-523	533-563	533-523	533-563
还原剂		MTG	DTT	MTG	MTG	MTG
%纯度 (CGE)	3 <sup>rd</sup> 柱前	97.5%	94%	97.5%	94%	97.5%
	3 <sup>rd</sup> 柱后	99.3%	99.88%	99.4%	>99%	99.2%
浓度 (A280nm) mg/ml	3 <sup>rd</sup> 柱前	0.84	0.42	0.84	0.42	0.84
	3 <sup>rd</sup> 柱后	0.239	0.17	0.847	0.637	0.173
剪切 (LC-MS)	3 <sup>rd</sup> 柱前	15%	15.2%	15%	15.2%	15%
	3 <sup>rd</sup> 柱后	N0	6.2%	N0	5.4%	1.6 (非还原的) 1.1 (还原的)
HCP (ppm)	3 <sup>rd</sup> 柱前	2515	~7223	2515	~7223	2515
	3 <sup>rd</sup> 柱后	30	1007.8	N0	673	152

[0622] UF/DF缓冲液交换 (533-616)

[0623] 通过切向流过滤浓缩533-616己基洗脱池,并渗滤到由1×PBS,0.5M精氨酸-HCl,1mM的单硫代甘油,pH 6.7组成的最终赋形剂缓冲液。

[0624] 在产物引入之前,膜用1×PBS平衡。在室温(21-23℃)下,将1×PBS,10%(重量/体积)精氨酸-HCl(0.5M精氨酸-HCl,对于533-616)(J.T.Baker,部件号2067),1mM的单硫代甘油(MP Biomedicals,目录号155727),pH 6.4以324LMH跨膜再循环。当在5kDa膜上时,将10-15psi和21-24psi的TMP施加到渗余物。用60.2ml的缓冲液计算保留体积。对于533-616,洗脱物的浓度从0.173mg/ml的1532ml的原始体积至1.4mg/ml的189.3ml的体积。浓缩后,对8渗余物体积:189.3ml×8=1514.4ml进行恒定体积渗滤。然后将其浓缩至163.4ml的体积,并稀释至1.0mg/ml的221.9ml的最终体积(209.5ml,对于533-616)。用52.3ml的缓冲液冲洗膜,并通过在室温下再循环0.1N的NaOH清洁≥60分钟。膜的再生是通过标准化的水渗透性测量进行验证的。最终纯化的CSP被冷冻储存在-80℃。

[0625] 缓冲液交换步骤的回收率是87.6%;通过SDS-CGE的纯度为99.8%。SDS-PAGE显示在交换到最终的缓冲液中后二聚体的量减少;通过SEC-HPLC的单体为97.6%。通过LC/MS还原后的N-末端剪切为2.7%和通过RP-HPLC的rCSP是90.3%。最终产物的分析表明,在A<sub>280</sub>下的1.05mg/ml,4EU/mg的内毒素水平,和通过HCP-ELISA的宿主细胞蛋白质水平为216ppm。分析数据汇总于表28中。

[0626] 表28.最终大批药物物质:测量的分析数据的总结

[0627]

样品名称	<b>533-563</b>
%纯度(SDS-CGE)	99.8%
浓度(A <sub>280</sub> )	1.05 mg/mL
(LC-MS) N-末端剪切	非还原的: 3.5% 还原的: 2.7%
宿主细胞蛋白质	216 ppm
内毒素	4 EU/mg
SEC-HPLC	97.6%单体
RP-HPLC	90.3% CSP
UF/DF 后产率	87.6 %
最终缓冲液	1X PBS, 0.5 M 精氨酸, 1 mM MTG, pH 6.7

[0628] 在使用20cm己基-650C第三柱(533-618)规模的生产

[0629] 使用实验室规模和112ml规模的己基-650C达到令人满意的HCP和二聚体还原效果,使用20cm,4.56L己基-650C柱尝试全规模技术转移生产运行。将已被冷冻在-80℃的离心滤液材料14天后解冻,并通过TMAE和CHT纯化。与TMAE和CHT纯化还原相同的一天开始1mM MTG的还原。翌日开始己基-650C纯化(己基洗脱物:533-617)。下一天该533-617己基-650C洗脱物被通过UF/DF转移到由1×PBS与1mM的MTG,0.5M精氨酸,pH 6.7组成的大量缓冲液,并被命名为533-618。533-617的A<sub>280</sub>色谱图显示在流过物中来自柱的小分子峰。分析来自

20cm柱的533-618BDS显示全部落在规格范围内的关键性能标准(表29)。

[0630] 表29. 对于533-618的大批药物物质释放测试结果, 己基-650C 20cm柱运行  
[0631]

内毒素(LAL-PTS)	4.1 EU/mL	
完整质量(还原的)	7.1%	
完整质量(未还原的)	7.7%	
SEC	<b>面积%</b>	
	HMW 聚集体	3.04
	二聚体	0.33
	单体	96.23
	低 MW	0.40
RP-HPLC	<b>Area %</b>	
	组 1:	5.28
	组 2:	3.6
	组 3:	1.9
	CSP:	72.11
	P-CSP:	16.75
	CSP+P-CSP	88.86
浓度	1.02 g/L, 通过 A <sub>280</sub>	
产量(填充前)	7.6 g	
产量(填充后)	7.1 g	
HCP	653 ppm	
总体纯化产率	~23 %	

[0632] 结论: 通过质谱法肽数据库分析鉴定宿主细胞蛋白质。没有鉴定的宿主细胞蛋白质被确认为毒性的。对比“高”(2-柱纯化)和“低”(3-柱纯化)量的含HCP的rCSP批次的免疫原性研究并未显示在rCSP制剂中不同水平的HCP所造成的rCSP免疫原性的差异。

[0633] 通过第三色谱步骤减少了大批药物物质中的HCP水平。使用含有1mM的MTG的轻度还原条件接着0.5至0M硫酸铵梯度的己基-650C色谱实现了最低的HCP水平以及低剪切和高纯度。

[0634] 实施例11: 用于减少裂解物中沉淀的方法

[0635] 评估阴离子交换色谱前用于减少裂解物中沉淀的方法对rCSP产率和纯度的影响。

[0636] 如所描述的, 在将其加载至TMAE阴离子交换柱之前, 冷冻和解冻裂解物可以增强rCSP纯度、浓度和产率。裂解物在2L瓶子中冷冻被评价为较大容器的替代, 由于其较高的表面积-体积比。通过所描述的方法制备百分之十的裂解物用于工程运行中。将含有10%的裂解物上清液(533-555, 从细胞糊533-446制备)的一个2L PETG瓶和含有去离子水的5×2L的PETG瓶置于Revco-80℃冰箱中。表30概述了随时间的冷冻进展。

[0637] 表30. 裂解物在1L PETG瓶中冷冻的进展

[0638]

时间	估计的%固体	描述	冰箱温度(°C)
T=4.5 小时	25-30%	DI 水表现 20% 冷冻的	-72 °C
T=7 小时	65-70%	裂解物出现固体; 粉色-橙色; 在 DI 水填充瓶中仍可见的液体区域	-72 °C
T=18.3 小时	100%	冷冻裂解物出现暗黄, 比在 7 小时色调轻得多	(未记录)

[0639] 为了建立用于解冻的预期时间,将含有10%的冷冻裂解物(533-555)的2升PETG瓶以及含有去离子水的6×2升的PETG瓶和含≤-76°C的冷冻液的各种1升和500ml的PETG瓶(共计24L冷冻液体)置于设定为25°C的Precision 270(Thermo Scientific)水浴中和水浴温度从不降到低于22°C。3.25小时后,随着瓶子的数次轻柔混合,10%的冷冻裂解物在22-23°C完全解冻。

[0640] 为了进一步减少沉淀,评估了已被完全冷冻的解冻裂解物的过滤。通过所描述的方法制备从用于制备工程运行3(533-485)的裂解物的相同细胞糊制成的百分之十裂解物(533-558),在2L PETG瓶中冷冻,并如上所述在2小时35分钟内解冻。根据在离心所需的额外时间中增加的N-末端剪切的可能性,在无离心的情况下过滤如果发现其充分减少沉淀物的量则被认为是所需的。为了确定离心所需的时间长度和力,在三种不同条件下对解冻的裂解物通过Sartobran P(0.45微米/0.2微米)膜过滤器过滤进行评估:没有离心,在15000×g下15分钟,在30000×g下30分钟。然后用 $V_{max}$ 方法来确定过滤器能力。 $V_{75}$ 值被认为是实际容量限制,因为在75%百分比堵塞下的流率是初始流率的大约25%。发现无离心的膜过滤产生足够用于生产的 $V_{75}$ 值(表31)。用0.45微米的过滤(尺寸足够小以防止TMAE树脂的结垢)被确定为无离心情况下是实用的,经过过滤进行TMAE色谱,但没有冷冻/解冻裂解物的离心。当对于增加的蛋白水解剪切的潜力衡量时,调节非离心与离心裂解物所需的较大过滤面积。以非离心样品所需的过滤器通量,rCSP浓度没有明显降低。

[0641] 表31.用Sartobran P(0.45 $\mu$ m/0.2 $\mu$ m)膜过滤器过滤的解冻裂解物533-558

[0642]

解冻的 533-558 裂解物条件	加载 OD600	滤液 OD600	$V_{75}$ (L/m <sup>2</sup> )	$V_{max}$ (L/m <sup>2</sup> )	$V_{75}$ 下推荐的 Sartobran P (0.45 μm/0.2 μm) 滤器面积
无离心	0.224-0.242	0.183- 0.212	18.2	36.4	1.3 m <sup>2</sup>
15 分钟, 15,000g, 上清液	0.207	0.177	22.5	45.0	1.1 m <sup>2</sup>
30 分钟, 15,000g, 上清液	0.166	0.126	29.6	59.2	0.8 m <sup>2</sup>

[0643] 使用0.65μm/0.45μm膜过滤器, 已知能提供足够的微粒去除以保护TMAE柱免于结垢的尺寸组合。用未离心的裂解物获得25L/m<sup>2</sup>的通量, 并且没有产生TMAE柱结垢。

[0644] 结果表明, 在2L瓶子中裂解物冻融之后, 使用0.2/0.45μm或0.65μm/0.45μm膜过滤而无需离心。这个附加的步骤减少沉淀以允许成功的色谱, 并导致与缩短的处理时间相关的rCSP的低水平N-末端剪切。



CIF143706P. s. 141223. 核苷酸或氨基酸序列表计算机可读载体.TXT  
序列表

<110> 菲尼克斯公司

<120> 用于纯化重组恶性疟原虫环子孢子蛋白的方法

<130> 38194-739.601

<140>

<141>

<150> 13/844, 261

<151> 2013-03-15

<150> 61/641, 105

<151> 2012-05-01

<160> 111

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 397

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫

<400> 1

[0001]

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr  
20 25 30

Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr  
35 40 45

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser  
50 55 60

Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn  
65 70 75 80

Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys Leu Lys Gln  
85 90 95

Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro  
100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro

	115	120	125
	Asn Ala Asn Pro 130	Asn Ala Asn Pro 135	Asn Ala Asn Pro 140
	Asn Ala Asn Pro 145	Asn Ala Asn Pro 150	Asn Ala Asn Pro 160
	Asn Ala Asn Pro 165	Asn Ala Asn Pro 170	Asn Ala Asn Pro 175
	Asn Ala Asn Pro 180	Asn Ala Asn Pro 185	Asn Ala Asn Pro 190
	Asn Ala Asn Pro 195	Asn Val Asp Pro 200	Asn Ala Asn Pro 205
	Asn Ala Asn Pro 210	Asn Ala Asn Pro 215	Asn Ala Asn Pro 220
[0002]	Asn Ala Asn Pro 225	Asn Ala Asn Pro 230	Asn Ala Asn Pro 240
	Asn Ala Asn Pro 245	Asn Ala Asn Pro 250	Asn Ala Asn Pro 255
	Asn Ala Asn Pro 260	Asn Ala Asn Pro 265	Asn Ala Asn Pro 270
	Asn Lys Asn Asn Gln Gly 275	Asn Gly Gln Gly His 280	Asn Met Pro Asn Asp 285
	Pro Asn Arg Asn Val 290	Asp Glu Asn Ala Asn Ala 295	Asn Ser Ala Val Lys 300
	Asn Asn Asn Asn Glu 305	Glu Pro Ser Asp Lys His 310	Ile Lys Glu Tyr Leu 320
	Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr 325	Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val 330	
	Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn		

	340		345		350
Lys Pro	Lys Asp Glu Leu Asp	Tyr Ala Asn Asp	Ile Glu Lys Lys Ile		
	355	360	365		
Cys Lys Met	Glu Lys Cys Ser Ser	Val Phe Asn Val	Val Asn Ser Ser		
	370	375	380		
Ile Gly Leu Ile	Met Val Leu Ser	Phe Leu Phe Leu	Asn		
	385	390	395		
<p>&lt;210&gt; 2          &lt;211&gt; 363          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成多肽</p> <p>&lt;400&gt; 2</p>					
Met Gln Glu Tyr	Gln Cys Tyr Gly	Ser Ser Ser	Asn Thr Arg	Val Leu	
1	5	10		15	
[0003]					
Asn Glu Leu	Asn Tyr Asp Asn	Ala Gly Thr	Asn Leu Tyr	Asn Glu Leu	
	20	25		30	
Glu Met Asn Tyr	Tyr Tyr Gly Lys	Gln Glu Asn Trp	Tyr Ser Leu Lys Lys		
	35	40	45		
Asn Ser Arg Ser	Leu Gly Glu Asn	Asp Asp Gly	Asn Asn Glu Asp	Asn	
	50	55	60		
Glu Lys Leu Arg	Lys Pro Lys His	Lys Lys Leu Lys	Gln Pro Ala Asp		
	65	70	75	80	
Gly Asn Pro Asp	Pro Asn Ala Asn	Pro Asn Val Asp	Pro Asn Ala Asn		
	85	90	95		
Pro Asn Val Asp	Pro Asn Ala Asn	Pro Asn Val Asp	Pro Asn Ala Asn		
	100	105	110		
Pro Asn Ala Asn	Pro Asn Ala Asn	Pro Asn Ala Asn	Pro Asn Ala Asn		
	115	120	125		

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
130 135 140

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
145 150 155 160

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
165 170 175

Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
180 185 190

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
195 200 205

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
210 215 220

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn  
225 230 235 240

[0004]

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn  
245 250 255

Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg  
260 265 270

Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn  
275 280 285

Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile  
290 295 300

Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly  
305 310 315 320

Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys  
325 330 335

Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met  
340 345 350

Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn  
355 360

<210> 3

<211> 362

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 3

Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn  
1 5 10 15

Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu  
20 25 30

Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn  
35 40 45

Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu  
50 55 60

[0005]

Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly  
65 70 75 80

Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro  
85 90 95

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro  
100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
115 120 125

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
130 135 140

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
145 150 155 160

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
165 170 175

[0006]

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
 180 185 190

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
 195 200 205

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
 210 215 220

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
 225 230 235 240

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn  
 245 250 255

Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn  
 260 265 270

Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn  
 275 280 285

Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln  
 290 295 300

Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn  
 305 310 315 320

Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp  
 325 330 335

Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu  
 340 345 350

Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn  
 355 360

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1194

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 恶性疟原虫

&lt;400&gt; 4

atgatgagaa aattagetat tttatctggt tcttcctttt tatttggttga ggccttattc

60

[0007]

caggaatacc agtgetatgg aagttcgtca aacacaaggg ttctaaatga attaaattat	120
gataatgcag gcaactaattt atataatgaa ttagaaatga attattatgg gaaacaggaa	180
aattgggtata gtcttaaaaa aaatagtaga tcaacttgag aaaatgatga tggaaataac	240
gaagacaacg agaaattaag gaaaccaaaa cataaaaaat taaageaacc ageggatggt	300
aatcctgata caaatgcaaa cccaaatgta gatcccaatg ccaacccaaa tgtagatcca	360
aatgcaaacc caaatgtaga tccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaacca	420
aatgcaaacc caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaacca	480
aatgcaaacc caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaacca	540
aatgcaaacc ccaatgcaaa tccaatgca aacccaaatg caaacccaaa cgtagatcct	600
aatgcaaate caaatgcaaa cccaaacgca aacccaaatg caaatccaaa tgcaaaccce	660
aatgcaaate ctaatgcaaa tccaatgcc aatccaaatg caaatccaaa tgcaaaccce	720
aacgcaaacc ccaatgcaaa tccaatgcc aatccaaatg caaatccaaa tgcaaaccce	780
aatgcaaacc caaatgcaaa ccccaatgca aatccaaata aaaacaatca aggtaatgga	840
caaggtcaca atatgcaaaa tgacccaaac cgaaatgtag atgaaaatgc taatgccaac	900
agtgetgtaa aaaataataa taacgaagaa ccaagtgata agcacataaa agaataatta	960
aacaaaatac aaaattctct tccaactgaa tggccccat gtagtgtaac ttgtggaaat	1020
ggtattcaag ttagaataaa gcttgctct gctaataaac ctaaagacga attagattat	1080
gcaaatgata ttgaaaaaaa aatttgtaaa atggaaaaat gtccagtggt gtttaatgtc	1140
gtaaatagtt caataggatt aataatggta ttatccttct tgttcettaa ttag	1194

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1086

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成多核苷酸

&lt;400&gt; 5

caggagtate aatgetatgg tagctcaagc aacaccgcg tctgaaatga gctgaactat	60
gacaacgceg ggacgaacct gtacaacgag ttggagatga actactacgg caaacaggag	120
aactggtaact cgcttaagaa gaacagccgg agtcteggtg aaaacgacga tggaaacaac	180
gaggacaacg aaaaactgcg caagccgaaa cataagaaac tgaaacagcc ggetgacgce	240

[0008]

aacccggacc cgaacgcaaa cccgaacgtg gacccgaatg caaacccgaa tgtggatccc	300
aatgcaaaacc cgaatgttga ccccaacget aacccgaacg cgaatccgaa tgccaacccg	360
aacgccaacc ccaacgccaa tccaaacgcc aatcctaacg caaacccgaa cgcgaaatccc	420
aatgctaacc ccaacgctaa ccctaacgcc aatccgaacg cgaacccgaa cgctaaccba	480
aacgcgaacc ctaacgccaa cccgaacgcc aaccctaacg ctaatcctaa tgtagacccc	540
aacgcgaacc cgaacgccaa ccctaacgcg aaccccaacg cgaacccgaa cgcgaaatccg	600
aacgccaate cgaatgcgaa tccaaacgcc aacccaaacg caaacccgaa cgcgaaatccc	660
aacgccaate ccaatgcgaa ccctaacgcc aatccaaatg caaatccgaa cgcgaaacccc	720
aacgccaate cgaacgccaa tccgaacgcg aaccccaata agaacaacca aggcaacggc	780
cagggccaca acatgcgaa cgacccaaac cgtaacgtcg atgaaaacgc taatgccaac	840
tccgccgtga agaataacaa taacgaagaa cccagcgaca aacacatcaa agagtacctg	900
aacaagatec aaaacagtct ctgaccgaa tggtcgccct gctccgtgac ctgegggaac	960
ggtattcagg tgcgcatcaa gcccggcage gccacaacgc cgaaggatga attggattac	1020
ggaacgaca tcgaaaagaa gatctgtaag atggagaagt gctccagcgt gtccaacgte	1080
gtcaac	1086

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1086

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: 合成多核苷酸

&lt;400&gt; 6

caagaatacc agtgttatgg cagctccagt aacactcgcg tgctcaatga gcttaactat	60
gacaacgcag gcaccaactt gtataacgaa ctggagatga attactacgg taaacaggag	120
aactggtaca gtctgaaaaa gaactcccgt tcaactcggcg aaaatgatga cgccaataac	180
gaggataacg aaaagttgcg caagccgaag cataagaaac tgaaacagcc agccgacggc	240
aacccggacc caaatgccaa tccgaacgtg gaccccaacg cgaatccaaa cgtggacccc	300
aacgccaacc ccaacgtgga ccccaacget aaccccaatg ctaatcccaa tgccaatccc	360
aatgccaate ccaacgcgaa ccccaacget aacccgaatg ccaaccccaa cgccaacecg	420
aacgcaaacc cgaacgcgaa cccgaacget aacccgaatg ccaacccgaa cgccaacca	480



[0009]

aacgcaaacc caaatgccaa tccaaacgcc aacccgaacg cgaatccetaa tgtggaccct 540  
aatgcgaacc cgaatgcgaa cccgaatgcc aacccgaacg ccaacccgaa cgcaaacccg 600  
aatgcgaacc ctaacgcaaa cccgaatgog aacccaaaacg cgaaccccaa cgcaaacccg 660  
aacgcgaacc cgaacgccaa ccctaacgct aacccaaaacg ccaacccgaa cgccaacccc 720  
aacgcgaate cgaacgcgaa ccctaacgcc aacccgaaca agaataacca aggtaacggg 780  
caaggacaca acatgcgaa cgacccgaac cggaacgtcg atgagaacgc caatgcgaac 840  
tcggcggtta agaacaacaa caatgaagaa cccagcgata aacacatcaa agaatacctg 900  
aacaaaatcc agaattcggt gageaccgag tggtegcctt gcagcgttac ctgcgggaac 960  
ggcattcagg tccgcacaa gccgggctcc gcccaataagc ccaaggatga gctggactac 1020  
gccaacgata tcgagaagaa gatctgcaag atggaaaagt gcagctcggg attcaacgtg 1080  
gtcaac 1086

<210> 7  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫

<400> 7  
Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro  
1 5 10 15

Lys His Lys Lys Leu  
20

<210> 8  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 恶性疟原虫

<400> 8  
Asp Lys Arg Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro  
1 5 10 15

Lys His Lys Lys Leu  
20

<210> 9  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: DsbA分泌前导肽

<400> 9

Met Arg Asn Leu Ile Leu Ser Ala Ala Leu Val Thr Ala Ser Leu Phe  
1 5 10 15

Gly Met Thr Ala Gln Ala  
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: Azu分泌前导肽

<400> 10

Met Phe Ala Lys Leu Val Ala Val Ser Leu Leu Thr Leu Ala Ser Gly  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Ala  
20

[0010]

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: Ibp-S31A分泌前导多肽

<400> 11

Met Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Thr Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Ser Leu Thr Leu Leu Ser Pro Ala Ala His Ala  
20 25 30

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: Tpr分泌前导肽

<400> 12

Met Asn Arg Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ala Phe Val Phe Leu Ser Gly  
 1 5 10 15

Cys Gln Ala Met Ala  
 20

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: CupB2分泌前导肽

<400> 13  
 Met Leu Phe Arg Thr Leu Leu Ala Ser Leu Thr Phe Ala Val Ile Ala  
 1 5 10 15

Gly Leu Pro Ser Thr Ala His Ala  
 20

[0011] <210> 14  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: CupA2分泌前导肽

<400> 14  
 Met Ser Cys Thr Arg Ala Phe Lys Pro Leu Leu Leu Ile Gly Leu Ala  
 1 5 10 15

Thr Leu Met Cys Ser His Ala Phe Ala  
 20 25

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: NikA分泌前导肽

<400> 15  
 Met Arg Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Leu Phe Ile Ala  
 1 5 10 15

Pro Met Ala Val Ala

20

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: Pbp A20V分泌前导肽

<400> 16  
 Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly  
 1 5 10 15

Val Ala Thr Val Asn Ala Val Ala  
 20

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: DsbC分泌前导肽

[0012]

<400> 17  
 Met Arg Leu Thr Gln Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ile Ala Leu Val Ser  
 1 5 10 15

Thr Phe Ala Leu Ala  
 20

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: TolB分泌前导肽

<400> 18  
 Met Arg Asn Leu Leu Arg Gly Met Leu Val Val Ile Cys Cys Met Ala  
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Ala Ala  
 20

<210> 19  
 <211> 24

<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 未知的描述: Pbp分泌前导肽

<400> 19  
Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala  
20

<210> 20  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 未知的描述: Lao分泌前导肽

<400> 20  
Met Gln Asn Tyr Lys Lys Phe Leu Leu Ala Ala Ala Val Ser Met Ala  
1 5 10 15

[0013]

Phe Ser Ala Thr Ala Met Ala  
20

<210> 21  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 未知的描述: CupC2分泌前导肽

<400> 21  
Met Pro Pro Arg Ser Ile Ala Ala Cys Leu Gly Leu Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Met Ala Thr Gln Ala Ala Ala  
20

<210> 22  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>

<223>未知的描述: PorE分泌前导肽

<400> 22

Met Lys Lys Ser Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Gly Ala Ile Ala  
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Ala  
20

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: Pbp分泌前导肽

<400> 23

Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly  
1 5 10 15

[0014] Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala  
20

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: FlgI分泌前导肽

<400> 24

Met Lys Phe Lys Gln Leu Met Ala Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Ala Val Ala Gln Ala  
20

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: ttg2C分泌前导多肽

<400> 25

Met Gln Asn Arg Thr Val Glu Ile Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Gly Ile Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Val Ser Gly Leu Ser  
20 25 30

Ala

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 26

Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser  
1 5 10

[0015]

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 27

Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg  
1 5

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 28

Cys Ser Ser Val  
1

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 29

Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn  
1 5 10 15

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 30

Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn  
1 5 10 15

Glu Leu Asn Tyr  
20

[0016]

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 31

Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 32

Asn Thr Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn  
1 5 10 15

Leu Tyr Asn



<210> 33  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 33  
Glu Leu Asn Tyr  
1

<210> 34  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 34  
Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn  
1                                 5                                 10

[0017]

<210> 35  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 35  
Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr  
1                                 5

<210> 36  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 36  
Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu  
1                                 5                                 10

<210> 37  
<211> 17  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 37

Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr  
1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 38

Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr  
1 5 10 15

[0018]

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 39

Thr Asn Leu Tyr Asn  
1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 40

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln  
1 5 10

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 41

Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu  
1 5 10 15

Lys Lys Asn

<210> 42

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 42

Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys  
1 5 10 15

[0019] Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn  
20

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 43

Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr  
1 5 10

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 44

Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu  
1 5 10 15

Gly

<210> 45  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 45  
 Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu  
 1                  5                  10                  15

Gly Glu Asn

<210> 46  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0020] <220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 46  
 Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn  
 1                  5                  10                  15

Asp

<210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 47  
 Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn  
 1                  5                  10                  15

<210> 48  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 48

Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg  
1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 49

Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp  
1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0021]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 50

Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn  
1 5 10

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 51

Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp  
1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 52

Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys Leu Lys Gln Pro  
1 5 10 15

Ala

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 53

Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1 5 10

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0022]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 54

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 55

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
1 5

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 56

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala  
20

<210> 57

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 57

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
1 5 10 15

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
20 25 30

Val

[0023]

<210> 58

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 58

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro  
20 25 30

Asn

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 59

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln  
1 5 10 15

Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val  
20 25 30

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 60

Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn  
1 5

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

[0024]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 61

Asp Pro Asn Arg Asn Val  
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 62

Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn  
1 5

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 63

Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val  
1 5 10 15

Lys Asn

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 64

Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala  
1 5

[0025]

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 65

Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn  
1 5

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 66

Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn  
1 5 10

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 67

Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn  
1 5

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 68

Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys  
1 5 10

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0026]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 69

Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Thr  
20

<210> 70

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 70

Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly  
20 25

<210> 71

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 71  
 Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser  
 1 5 10 15

<210> 72  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 72  
 Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val  
 20 25 30

[0027]

Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys  
 35 40

<210> 73  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 73  
 Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn  
 20 25

<210> 74  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 74

Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr  
1 5 10 15

Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg  
20 25 30

Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys  
35 40

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 75

Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr  
1 5 10 15

[0028]

<210> 76

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 76

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro  
1 5 10 15

Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly  
20 25 30

Ser Ala Asn Lys Pro Lys  
35

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 77

Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg  
1 5 10

<210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 78

Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn  
1 5 10 15

Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys  
20 25

<210> 79

<211> 26

<212> PRT

[0029] <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 79

Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn  
1 5 10 15

Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln  
20 25

<210> 80

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 80

Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu  
1 5 10 15

Met Asn Tyr Tyr Gly Lys  
20

<210> 81  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 81  
 Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met  
 1 5 10 15

Asn Tyr Tyr Gly Lys  
 20

<210> 82  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

[0030] <400> 82  
 Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr  
 1 5 10 15

Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys  
 20 25

<210> 83  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 83  
 Thr Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu  
 1 5 10 15

Asn Trp Tyr Ser Leu Lys  
 20

<210> 84  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 84

Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Lys  
20

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 85

Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys  
1 5

[0031]

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 86

Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys  
1 5

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 87

Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu  
1 5 10 15

Arg

<210> 88  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 88  
 Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys  
 1 5 10 15

<210> 89  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 89  
 Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys  
 1 5 10

[0032] <210> 90  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 90  
 Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys  
 1 5

<210> 91  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 91  
 Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn  
 1 5 10 15

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp  
 20 25



<210> 92  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 92  
 Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn  
 1 5 10 15

Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg  
 20 25

<210> 93  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

[0033] <400> 93  
 Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His  
 1 5 10 15

Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg  
 20

<210> 94  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 94  
 Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn  
 1 5 10 15

Arg

<210> 95  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 95

Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn  
1 5 10

<210> 96

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 96

Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys  
20

[0034]

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 97

Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys  
1 5 10

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 98

Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn  
1 5 10 15

Asn Glu

<210> 99  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 99  
 Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys  
 1 5 10

<210> 100  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 100  
 His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu  
 1 5 10 15

[0035] Trp

<210> 101  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 101  
 Glu Tyr Leu Asn Lys  
 1 5

<210> 102  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 102  
 Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys  
 1 5 10 15

Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg  
20

<210> 103  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 103  
Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys  
1 5 10 15

Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly  
20 25

<210> 104  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0036] <220>  
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 104  
Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala  
1 5 10 15

Asn Asp Ile Glu Lys Lys  
20

<210> 105  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 105  
Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala  
1 5 10 15

Asn Asp Ile Glu Lys  
20

<210> 106

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 106  
 Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys  
 1 5 10

<210> 107  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 107  
 Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys  
 1 5 10

[0037]

<210> 108  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 108  
 Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn  
 1 5

<210> 109  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 109  
 Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val  
 1 5

<210> 110  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 烷基化-Cys

<400> 110  
 Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn Glu  
 1 5 10 15

[0038]

<210> 111  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 111  
 Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn  
 1 5 10 15

Glu

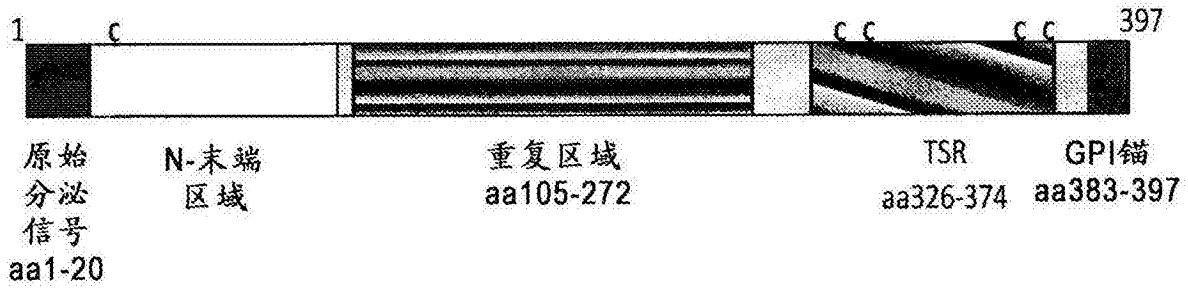


图1

A. 恶性疟原虫3D7 CS蛋白质Genbank登记号CA838998 (SEQ ID NO: 1)

预测的信号肽

```

1  MMEKLAQLAILSV SSFLFVEALF QEYQQCYGSSS NTRVLNELNY DNAGTNLYNE
51  LEMNYVGKQE NWYSLKKNSR SLGENDDGWN EDNEKLRRKPK HKKLLKQPADG
101 NPOPNANPNV DPNANPHVDF NANFNVDFNA NPNANPNANP NANFNANPNA
151 NPNANPNANP NANFNANPNA NPNANPNANP NANFNANPNA NPNANPNVDF
201 NANFNANPNA NPNANPNANP NANFNANPNA NPNANPNANP NANFNANPNA
251 NPNANPNANP NANFNANPNA NPNKNNQGWG QGHNMPNDPN RNVDENANAN
    
```

血小板反应蛋白1型结构域

```

301 SAVKNNNNEE PSDKHIKEYL NKIQNSLSTE WSPCSVTCGN GIQVRIKPGS
    血小板反应蛋白1型结构域 推定的GPI锚
351 ANKPKDELDY ANDIEKKICK MEKCSSVFNV VNSSIGLIMV LSFLFLN
    
```

图2A

B. 胞质CSP (SEQ ID NO: 2):

```

1  MQEYQQYGSS SNTRVLNELN YDNAGTNLYN ELEMNYYGKQ ENWYSLKKNS
51  RSLGENDDGN NEDNEKLRRKF KHKLLKQPAD GNFDPNANPN VDPNANPNVD
101 FNANPNVDPN ANPNANPNAN PNANPNANPN ANPNANPNAN FNANPNANPN
151 ANPNANPNAN FNANPNANPN ANPNANPNVD FNANPNANPN ANPNANPNAN
201 FNANPNANPN ANPNANPNAN PNANPNANPN ANPNANPNAN FNANPNANPN
251 ANPNANPNAN QGGHNMPNDP NRRVDENANA NGAVKNNNNEE EPSDKHIKEY
    
```

血小板反应蛋白1型结构域

```

301 LNKIQNSLST EWSPCSVTCG NGIQVRIKPG SANKPKDELD YANDIEKKIC
    血小板反应蛋白1型结构域
351 KMEKCSSVFNV VVN
    
```

图2B

C. 周质CSP (SEQ ID NO: 3):

```

1   QEYQ@YGSSS NTRVLNELNY DNAGTNLYNE LEMNYYGQEQE NWYSLEKNSR
51  SLGENDDGNN EDNEKLRKPK HKKLRQPADG NPDFNANPNV DFNANPNVDP
101 NANPNVDFNA NFNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNANPNA
151 NPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNVDP NANPNANPNA NFNANPNANP
201 NANPNANPNA NFNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNANPNA
251 NPNKNNQGNG QGHNMPNDPN RNVDENANAN SAVKNNNNNEE PSDKHIKEYL
      血小板反应蛋白1型结构域
-----
301 NKIQNSLSTE WSP@SVT@GN GIQVRIKPGS ANKPKDELDY ANDIENKIKK
      血小板反应蛋白1型结构域
-----
351 MEK@SSVFNV VN
    
```

图2C

A. 恶性疟原虫3D7 CS核苷酸Genbank登记号XM\_001351086.1 (SEQ ID NO: 4)

```

1141 atgatgagaa aattagctat tttatctggt tcttctcttt tattttggtga ggccttattc
61  caggaatacc agtgcctatgg aagttcgtca aacacaaggg ttctaaatga attaaattat
121 gataatgcag gcactaattt atataatgaa ttagaaatga attattatgg gaaacaggaa
181 aattgggtata gtcttaaaaa aatagtaga tcaacttggag aaaatgatga tggaaataac
241 gaagacaacg agaaattaag gaaacaaaa cataaaaaat taaagcaacc agcggatggt
301 aatcctgata caaatgcaaa ccaaatgta gatcccaatg ccaacccaaa tgtagatcca
361 aatgcaaacg caaatgtaga tcaaatgca aacccaatg caaacccaaa tgcacaacca
421 aatgcaaacg caaatgcaaa ccaaatgca aacccaatg caaacccaaa tgcacaacca
481 aatgcaaacg caaatgcaaa ccaaatgca aacccaatg caaacccaaa tgcacaacca
541 aatgcaaacg ccaatgcaaa tctaatgca aacccaatg caaacccaaa cgtagatcct
601 aatgcaaatc caaatgcasa ccaaacgcg aacccaatg caaatccaaa tgcacaacca
661 aatgcaaatc ctaaatgcaaa tctaatgca aatcccaatg caaatccaaa tgcacaacca
721 aacgcaaacg ccaatgcaaa tctaatgca aatcccaatg caaatccaaa tgcacaacca
781 aatgcaaacg caaatgcaaa cccaatgca aatcctasta aaaacaatca aggtaatgga
841 caaggtcaca atatgcaaaa tgacccaaac cgaatgtag atgaaaatgc taatgccaac
901 agtgctgtaa aaaataataa taacgaagaa ccaagtgata agcaacataa agaatattta
961 aacaaaaaac aaaattctct ttcaactgaa tgggtcccat gtagtgtaac ttgtggaaat
1021 ggtattcaag ttagaataaa gcttggctct gctaataaac ctaaagacga attagattat
1081 gcaaatgata ttgaaaaaaaa aatttgtaa atggaaaaat gttccagtggt gtttaatgct
1141 gtaaatagtt caataggatt aataatggta ttatctctct tgttccctaa ttag
    
```

图3A



**B. (SEQ ID NO: 5)优化的CSP核酸序列1 编码图2C的氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 3)**

```

1   caggagtatc aatgctatgg tagctcaagc aacaccccgg tccctgaatga gctgaactat
61  gacaacgccc ggacgaacct gtacaacgag ttggagatga actactacgg caaacaggag
121 aactggtaact cgettaagaa gascagccgg agtctcggtg aaaaagaoga tggaaacaac
181 gaggacaacg aaaaactgcg caagccgaaa cataagaaac tgaaacagcc ggcgacggc
241 aaccgggacc cgaacgcaaa cccgaacgtg gacccgaatg caaacccgaa tgtggatccc
301 aatgcaaaac cgaatgttga ccccaacgct aaccggaacg cgaatccgaa tgcacaaccc
361 aaogccaacc ccaacgcaaa tccaaacgcc aatcctaacc caaacccgaa cgggaatccc
421 aatgctaacc ccaacgctaa cctaacgccc aatccgaacg cgaacccgaa cgttaaccca
481 aaogcgaacc ctaacgcaaa cccgaacgccc aaccctaacc ctaatccta tgtgaccccc
541 aaogcgaacc cgaacgcaaa cctaacgccc aaccccaacc cgaacccgaa cgggaatccc
601 aaogccaacc cgaatgcgaa tccaaacgccc aacccaaacc caaacccgaa cgcgaatccc
661 aaogccaacc ccaatgcgaa cctaacgccc aatccaaatg caaatccgaa cgggaacccc
721 aacgccaacc cgaacgcaaa tccgaacgccc aaccccaata agaacaacca aggcaacggc
781 cagggccaca acatgcgaa cgaacccaaac cgtaacgctc atgaaaacgc taatgccaac
841 tcggccgtga agaataacaa taacgaagaa cccagcgaca aacacatcaa agaglacctg
901 aacaagatcc aaaaacgctc ctogaccgaa tggtcgcctt gctccgtgac ctgcccgaac
961 ggtattcagg tgcgcatcaa gccgggcagc gccacaagc cgaaggatga attggattac
1021 gcgaacgaca tcgaaaagaa gatctgtaag atggagaagt gctccagcgt gttcaacgtc
1081 gtcaac

```

图3B

**C. (SEQ ID NO: 6)优化的CSP核酸序列2 编码图2C的氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)**

```

1   caagaatacc agtgttatgg cagctccagt aacactcggg tgcctcaatga gcttaactat
61  gacaacgccc gcaccaactt gtataacgaa ctggagatga attactacgg taaacaggag
121 aactcgtaca gtctgaaaaa gaactcccgt tcaactcggc aaaaatgatga cggcaataac
181 gaggataacg aaaaagtggc caagccgaag cataagaaac tgaaacagcc agccgacggc
241 aaccgggacc caaatgcaaa tccgaacgtg gaccccaacc cgaatccaaa cgtggacccc
301 aacgccaacc ccaacgctga ccccaacgct aaccccaatg ctaatcccaa tgcacaatccc
361 aatgccaacc ccaacgctga ccccaacgct aaccccaatg ccaaccccaa cgcacaacccc
421 aacgcaaac cgaacgcaaa cccgaacgct aaccccaatg ccaaccccaa cgcacaaccca
481 aacgcaaac caaatgcaaa tccctaaccg aaccccaatg cgaatccta tgtggacccc
541 aatgcaaac cgaatgcaaa cccgaatgca aaccccaatg ccaaccccaa cgcacaacccc
601 aatgcaaac ctaacgcaaa cccgaatgca aacccaaacg cgaaccccaa cgcacaacccc
661 aacgcaaac cgaacgcaaa cctaacgctt aacccaaacg ccaaccccaa cgcacaacccc
721 aacgcaaac cgaacgcaaa cctaacgccc aaccgcaaac agaataacca aggtaacggg
781 caaggacaca acatgcgaa cgaacccgaa cggaacgctc atgagaacgc caatgcgaac
841 tcggccgtta agaacaacaa caatgaagaa cccagcgata aacacatcaa agaatacctg
901 aacaacatcc agaathcgtt ggcacccgag tggtcgcctt gcagcgttac ctgcccgaac
961 ggcattcagg tccgcatcaa gccgggcctc gcccaataag ccaaggatga gctggactac
1021 gccaacgata tcgagaagaa gatctgcaag atggaaaagt gcagcctcgt attcaacgctg
1081 gtcaac

```

图3C

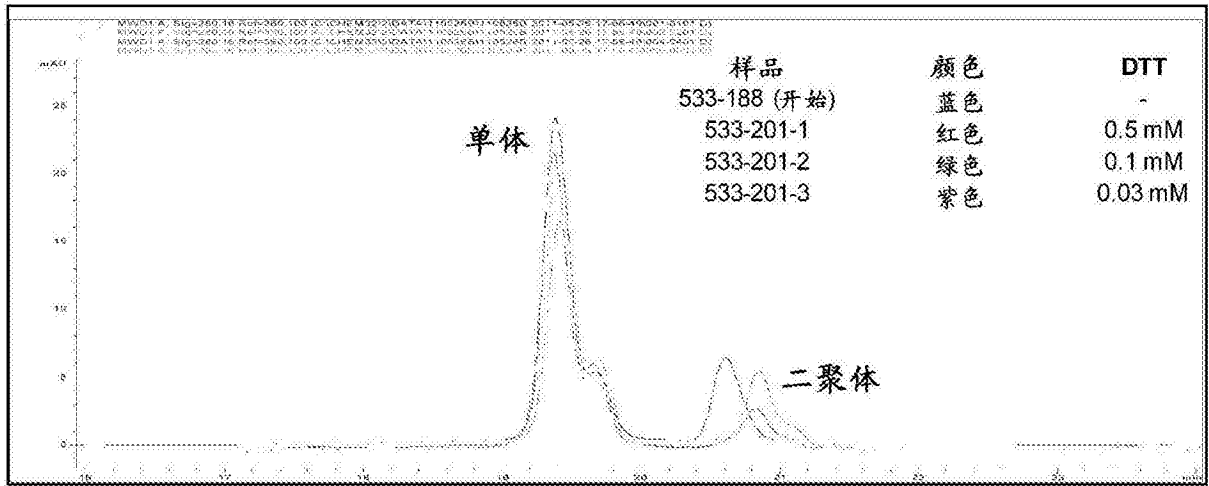


图4A

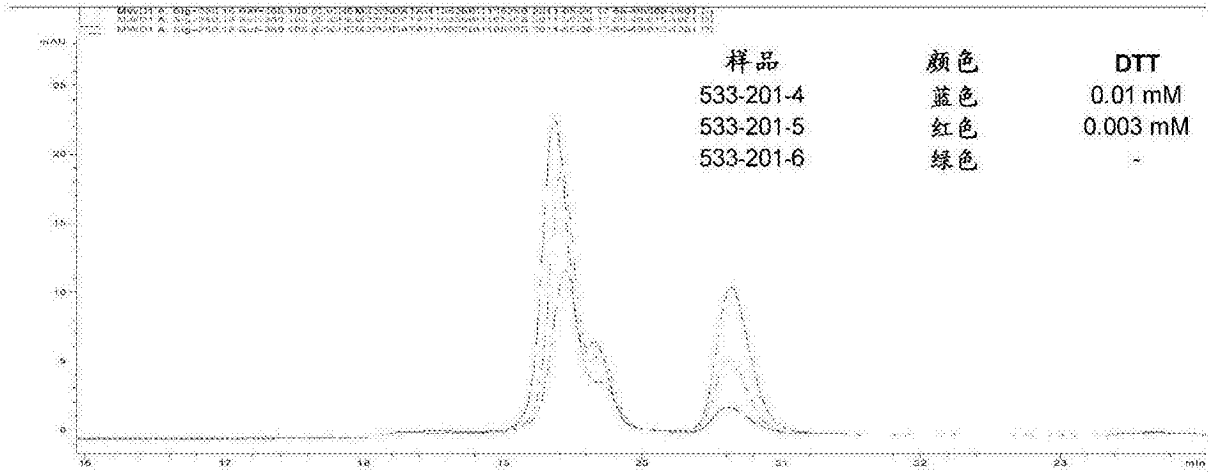


图4B

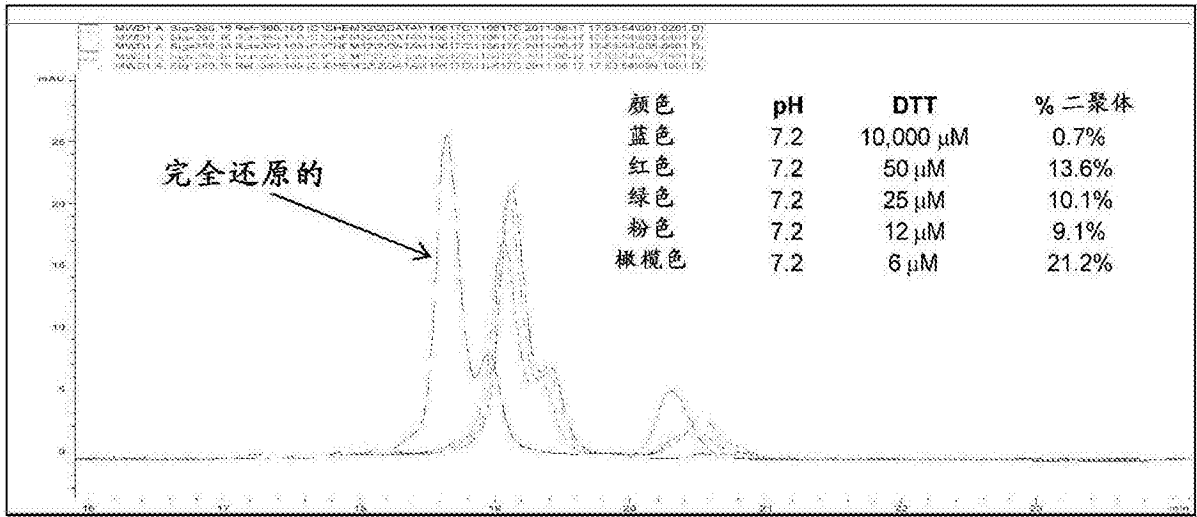


图5A

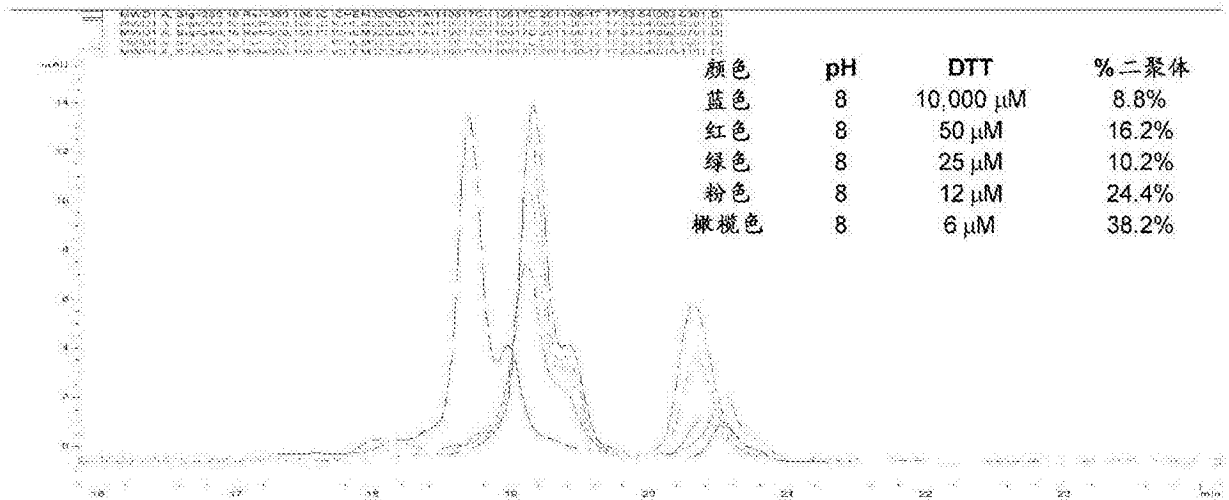


图5B

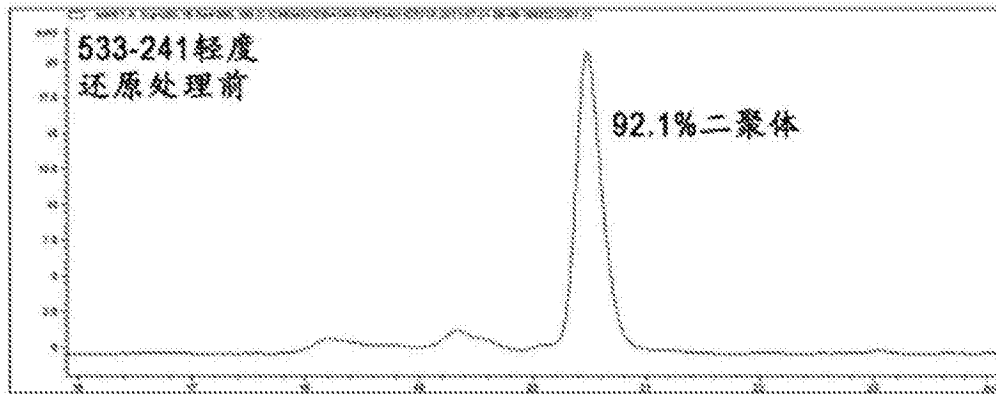


图6A

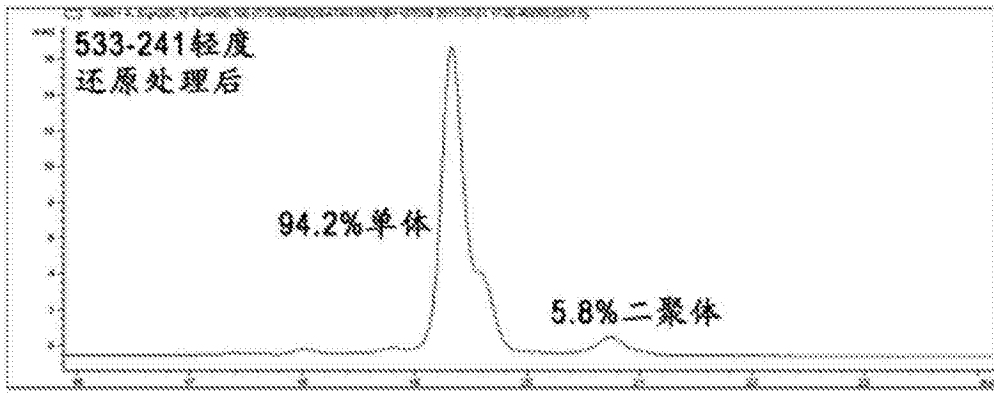


图6B

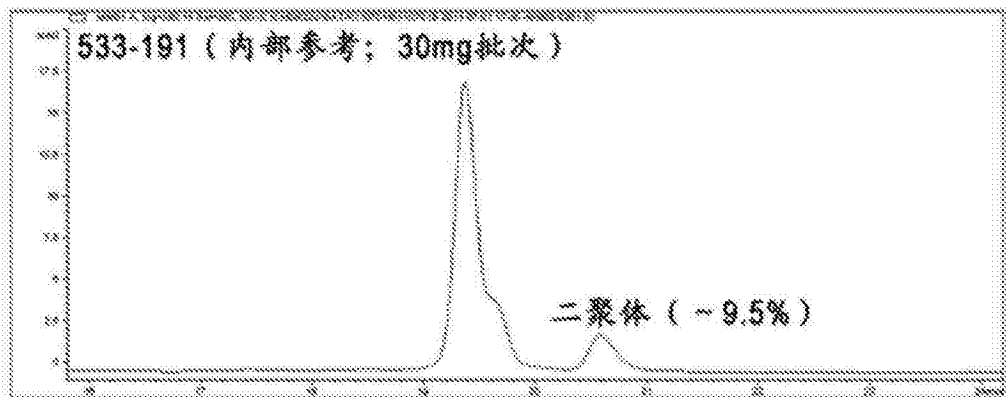


图6C

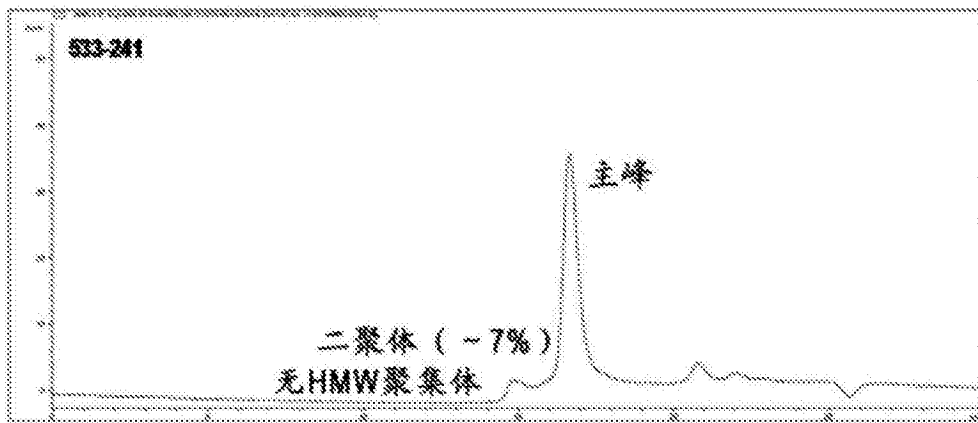


图7A

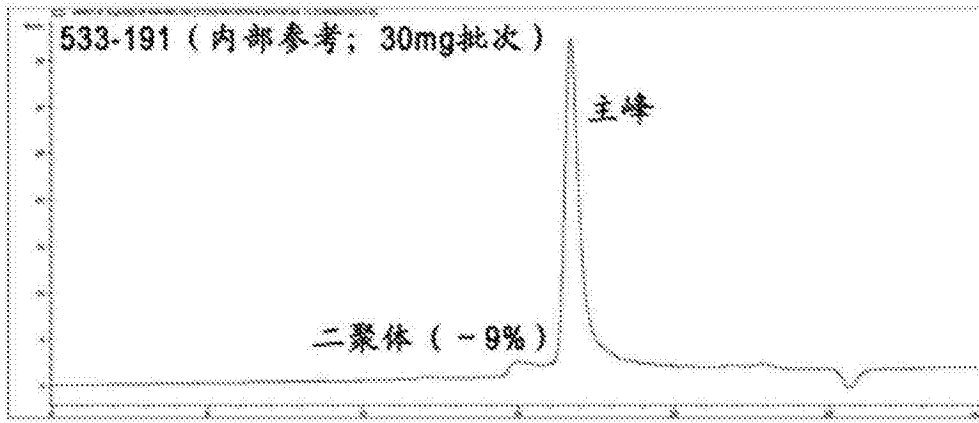


图7B

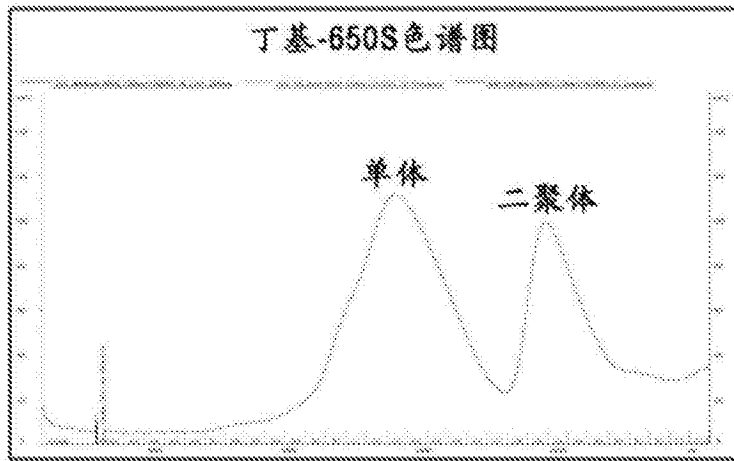


图8A

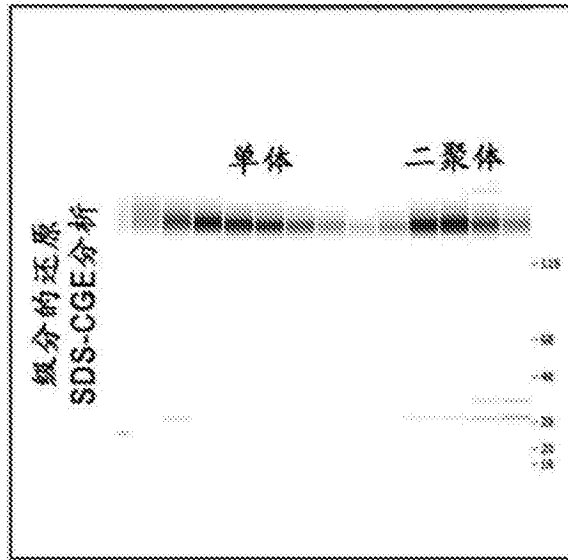


图8B

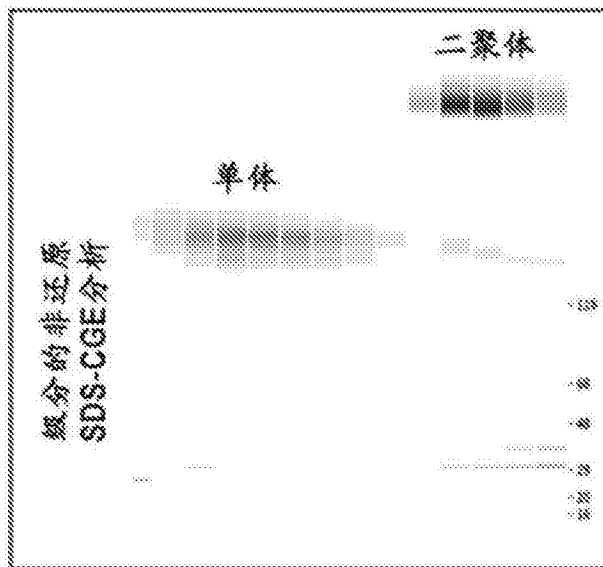


图8C

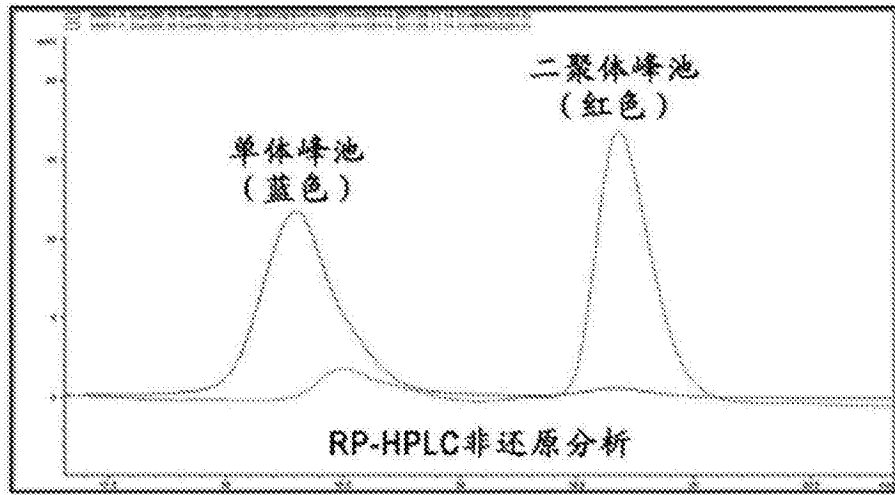


图8D

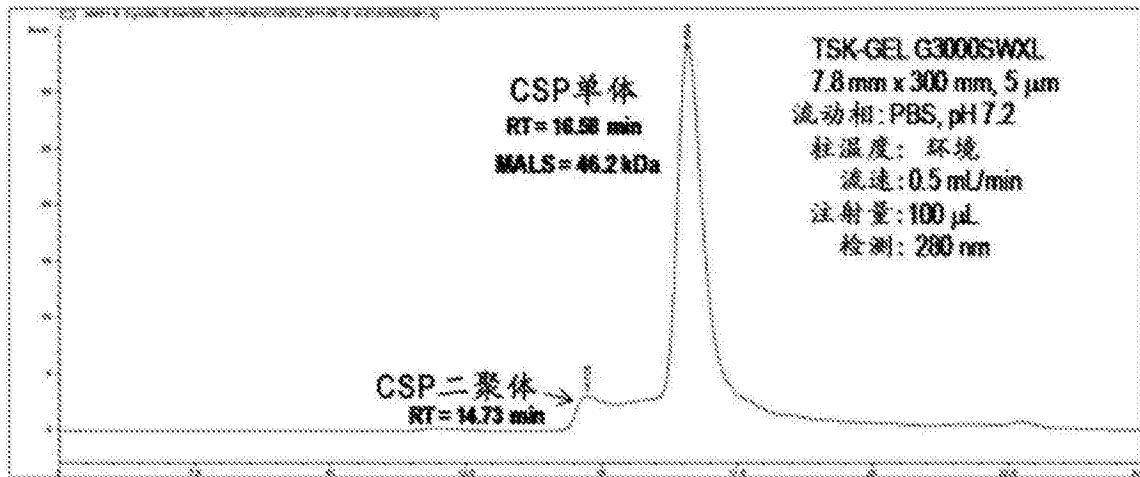


图9A

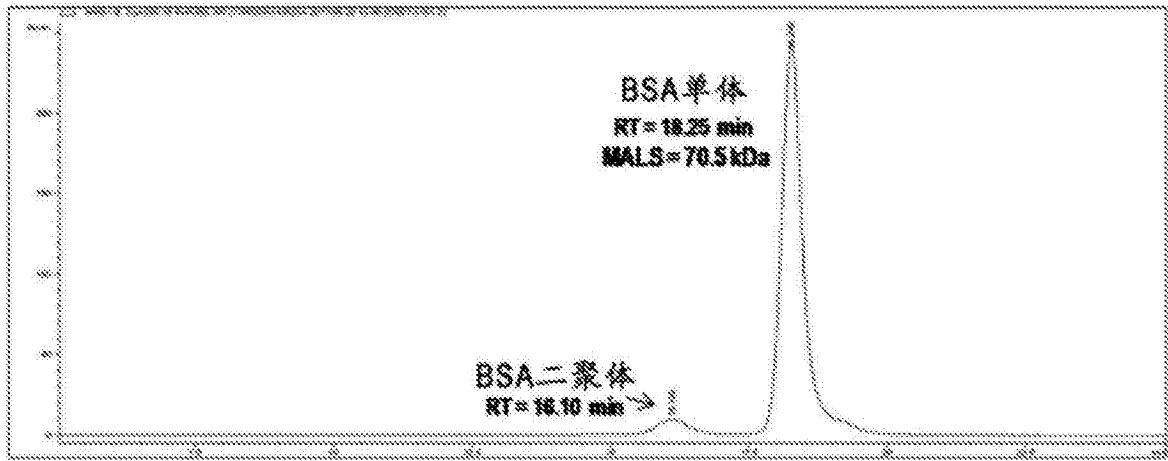


图9B

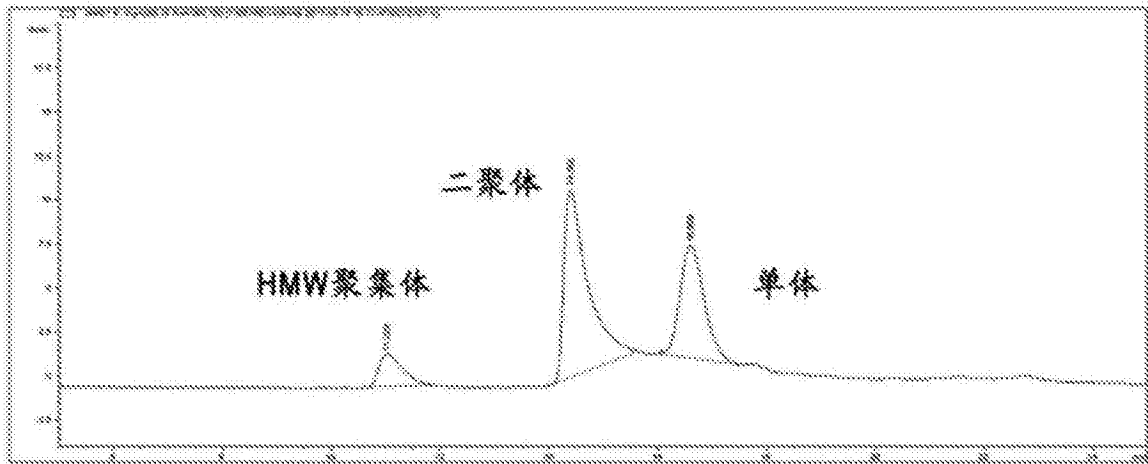


图10A

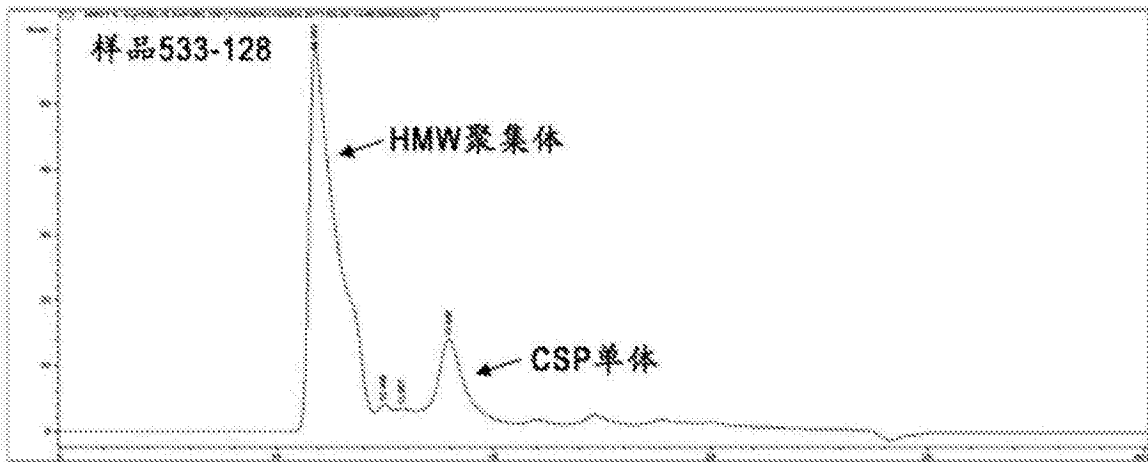


图10B



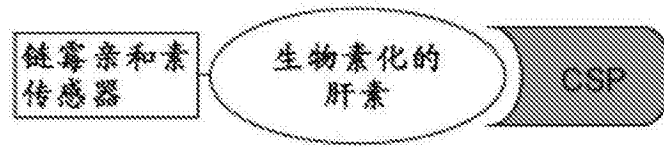


图11A

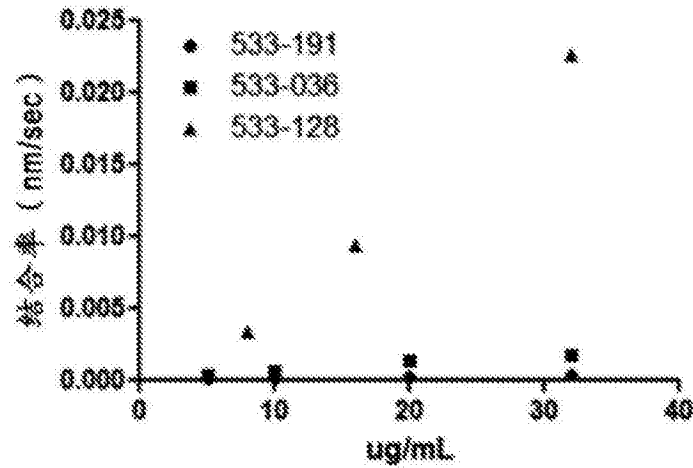


图11B

CSP结合率的比较

CSP 批次	CSP $\mu\text{g/mL}$	结合率 (nm/sec)	StDev	备注
533-036	5	3.70E-04	1.41E-05	10 mg 批次 [低聚集水平]
	10	7.00E-04		
	20	1.41E-03	1.13E-04	
	32	1.74E-03	1.41E-05	
533-191	5	1.00E-04	2.83E-05	30 mg 批次 [无聚集]
	10	1.25E-04	2.12E-05	
	20	2.20E-04	5.66E-05	
	32	3.85E-04	6.36E-05	
533-128	8	3.39E-03	1.84E-04	3 g 批次 [非常高聚集]
	16	9.38E-03	2.12E-04	
	32	2.27E-02	6.36E-05	

图11C

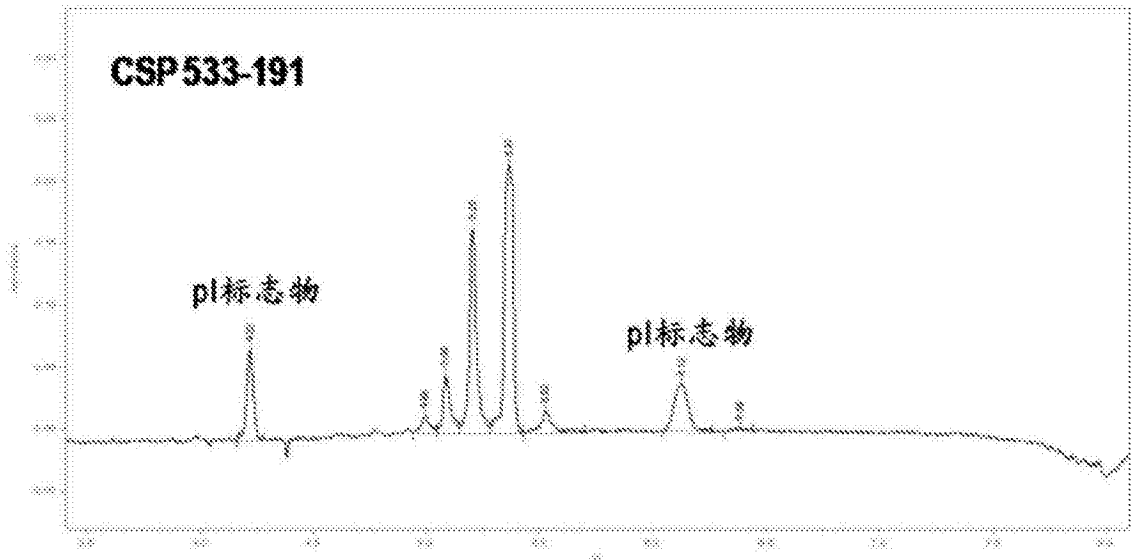


图12A

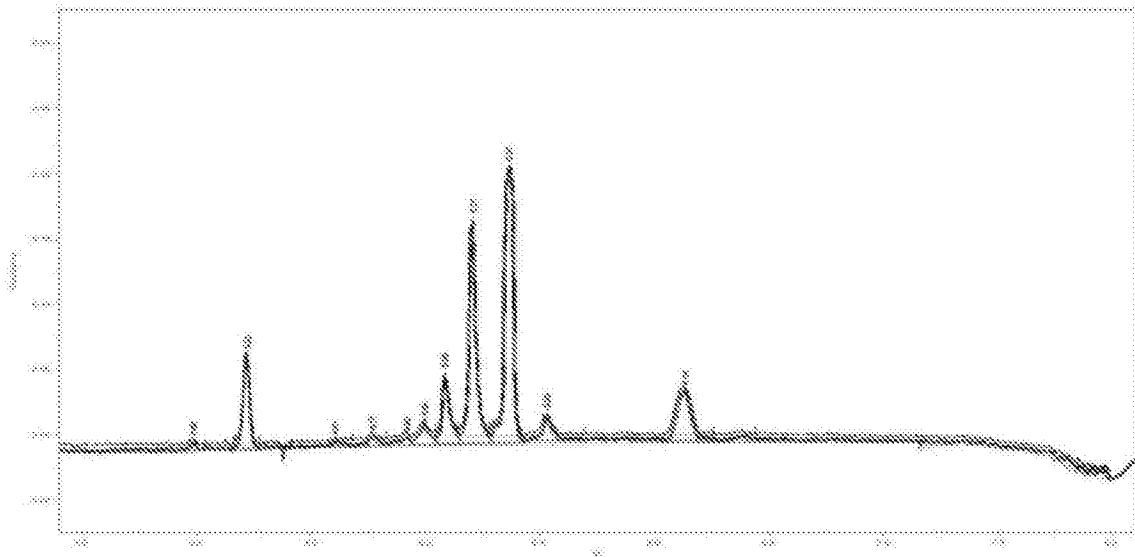


图12B

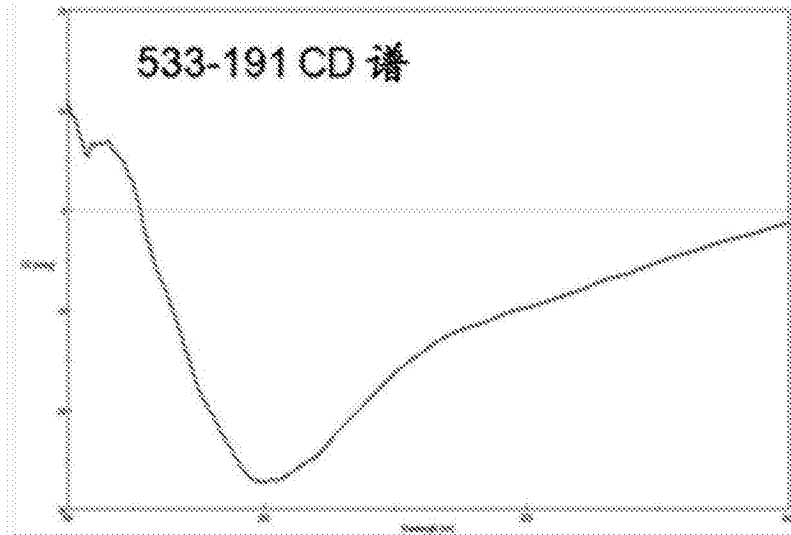


图13A

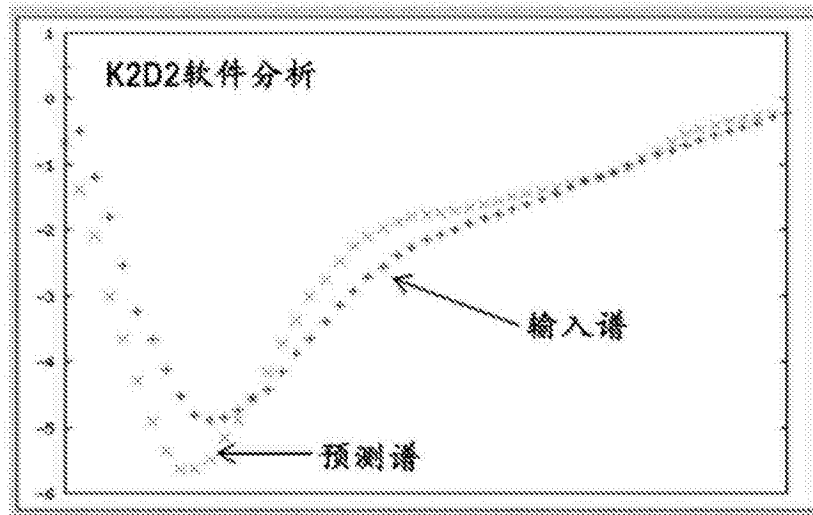


图13B

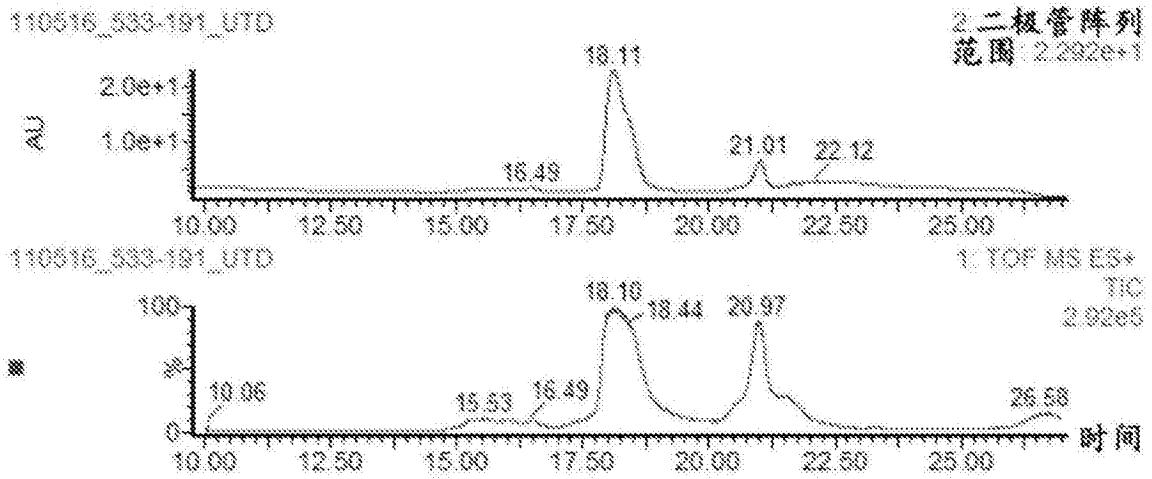


图14A

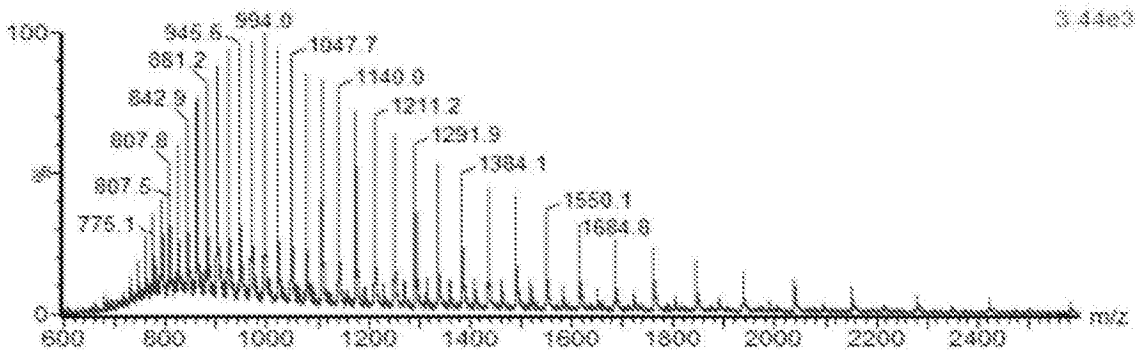


图14B

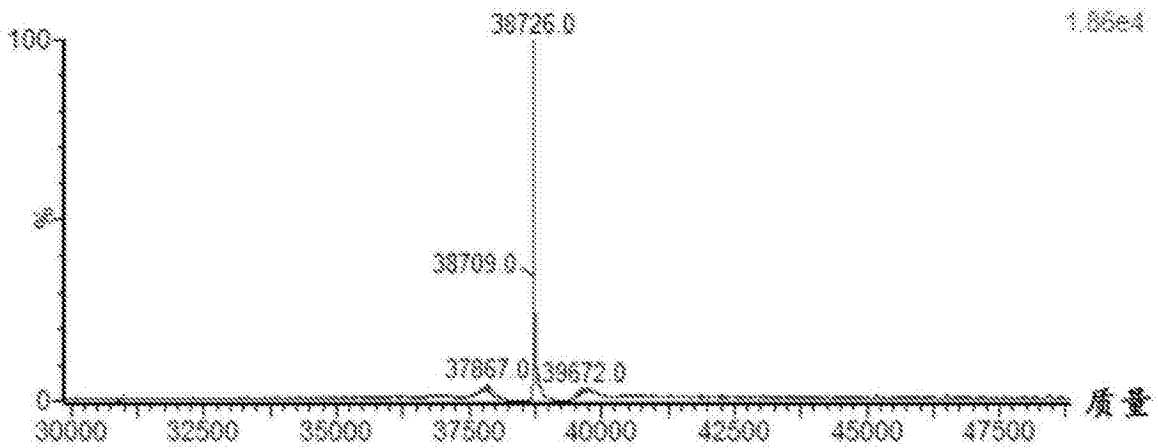


图14C

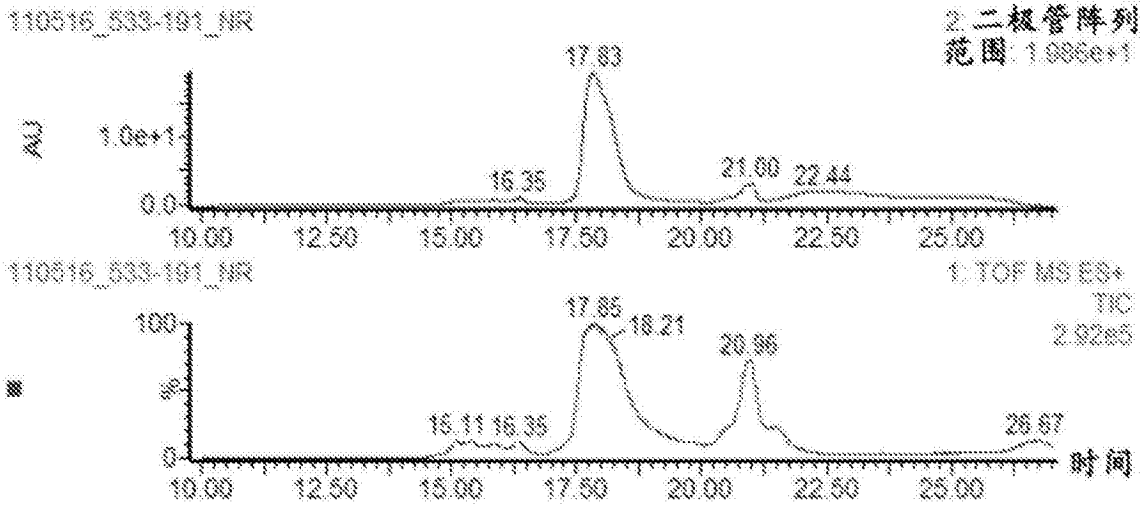


图14D

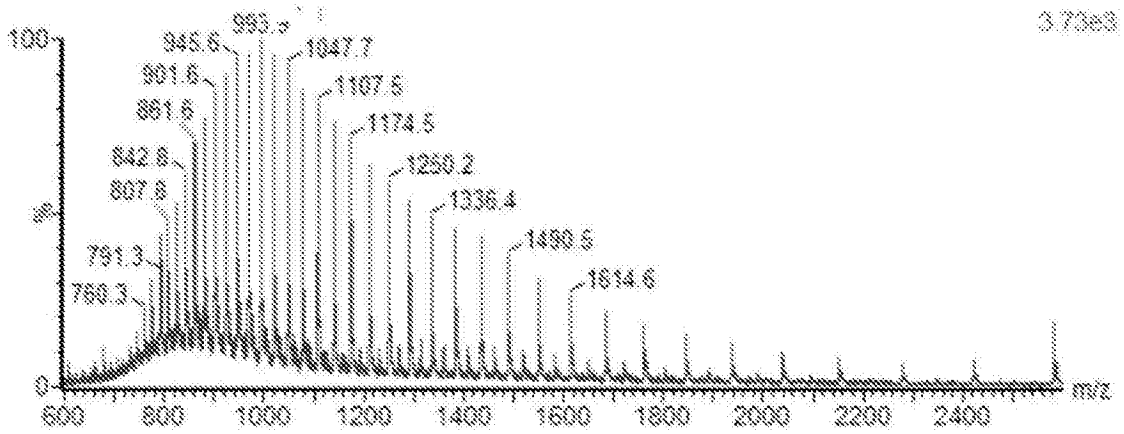


图14E

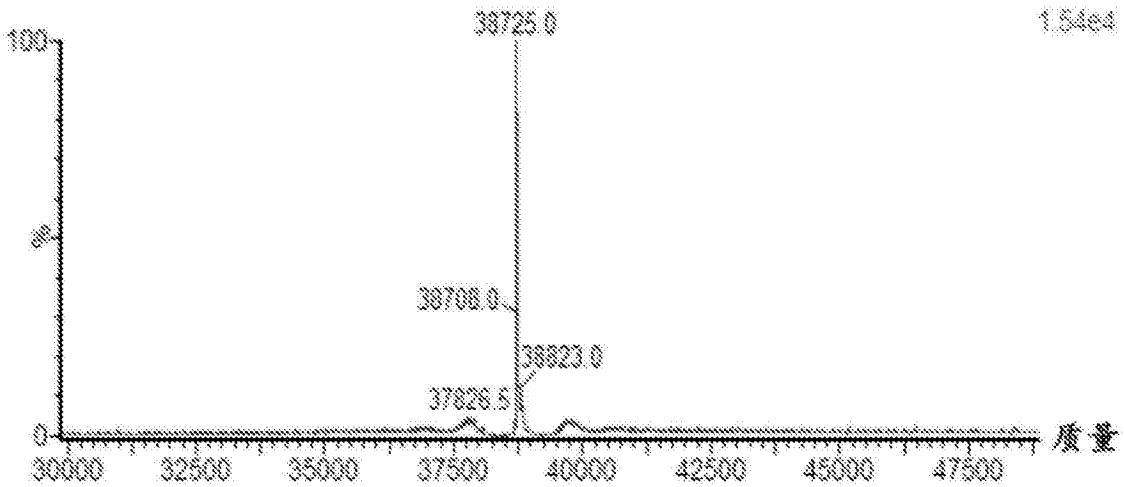


图14F

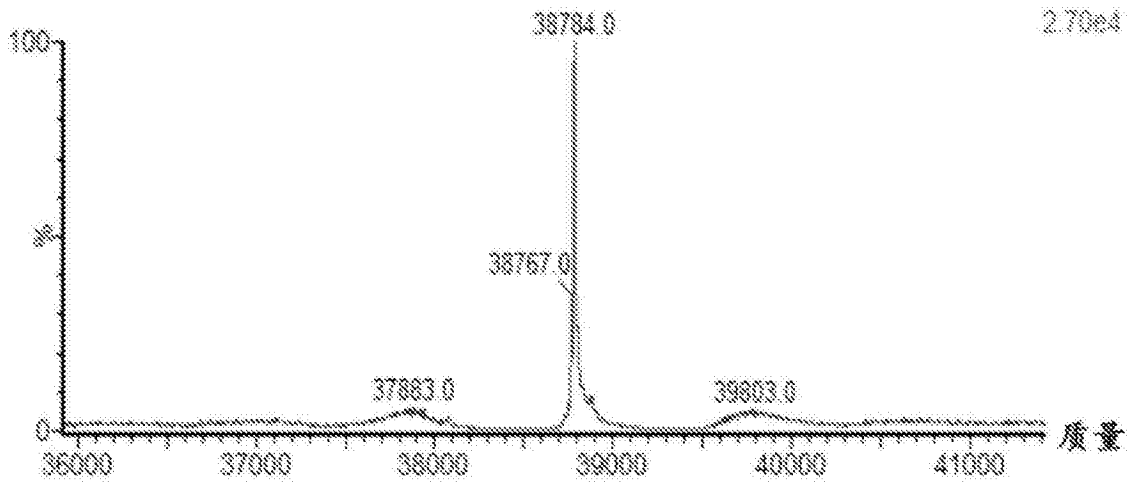


图15A

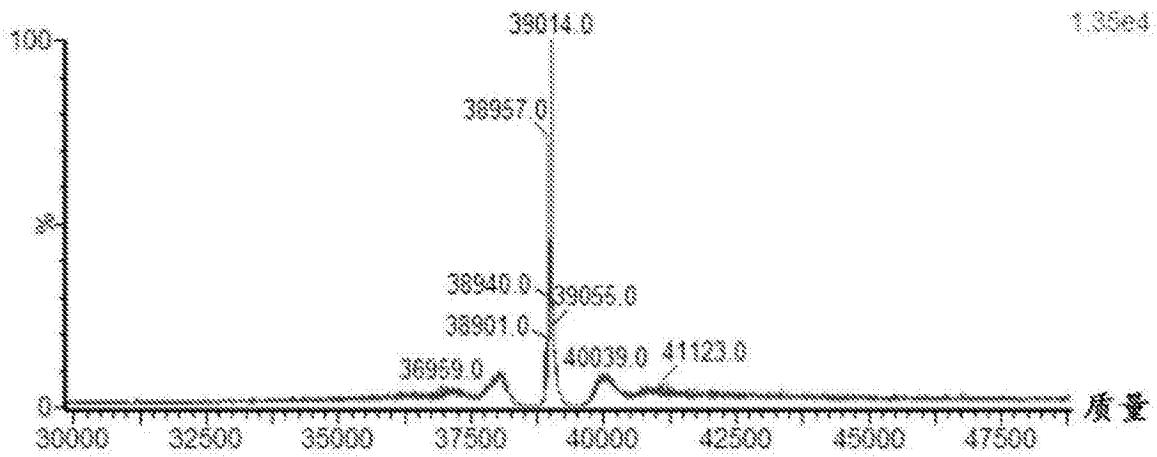


图15B

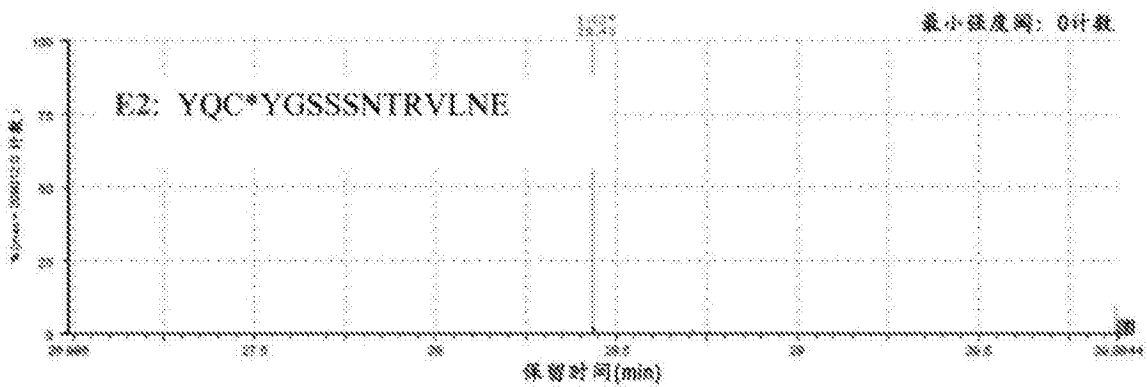


图16A

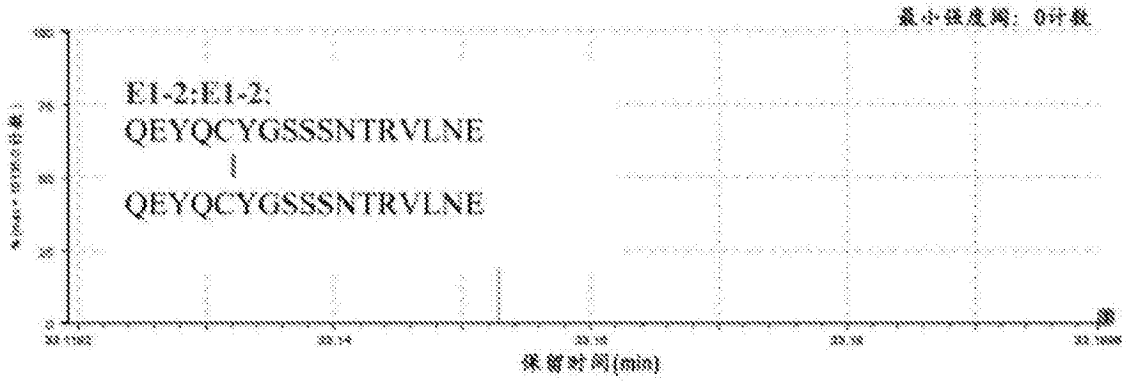


图16B

1	QEYQCYGSSSS	NTRVLNRLVY	GRAGTILYNE	LESNVYGHQK	NFYSLGK
51	SLGEND	GRNKLKPK	NKLLKQPADG	NFDNANFVY	DFNANFVD
101	NANFVDFNA	NANFNA			NANFNA
151	NANFNA	NANFNA	NANFVY		
201				NANF	NANFNA
251	NFNKNGGK	QGHNRPDP	NFDNANAN	SAVGNNEE	FSCHIKKEL
301	NKIQNLSTE	NFPDVTGK	GIQVRIKPGG	ANPKDELY	ANPKELK
351	NKSEVPSV	VN			

图17A

1	QEYQCYGSSSS	NTRVLNRLVY	GRAGTILYNE	LESNVYGHQK	NFYSLGK
51	SLGENDGNN	GRNKLKPK	NKLLKQPADG	NFDNANFVY	DFNANFVD
101			NKLLKQPADG	NFDNANFVY	DFNANFVY
151			NFDNANFVY	NFDNANFVY	DFNANFVY
201					NANFNA
251	NFNKNGGK	QGHNRPDP	NFDNANAN	SAVGNNEE	FSCHIKKEL
301	NKIQNLSTE	NFPDVTGK	GIQVRIKPGG	ANPKDELY	ANPKELK
351	NKSEVPSV	VN			

图17B

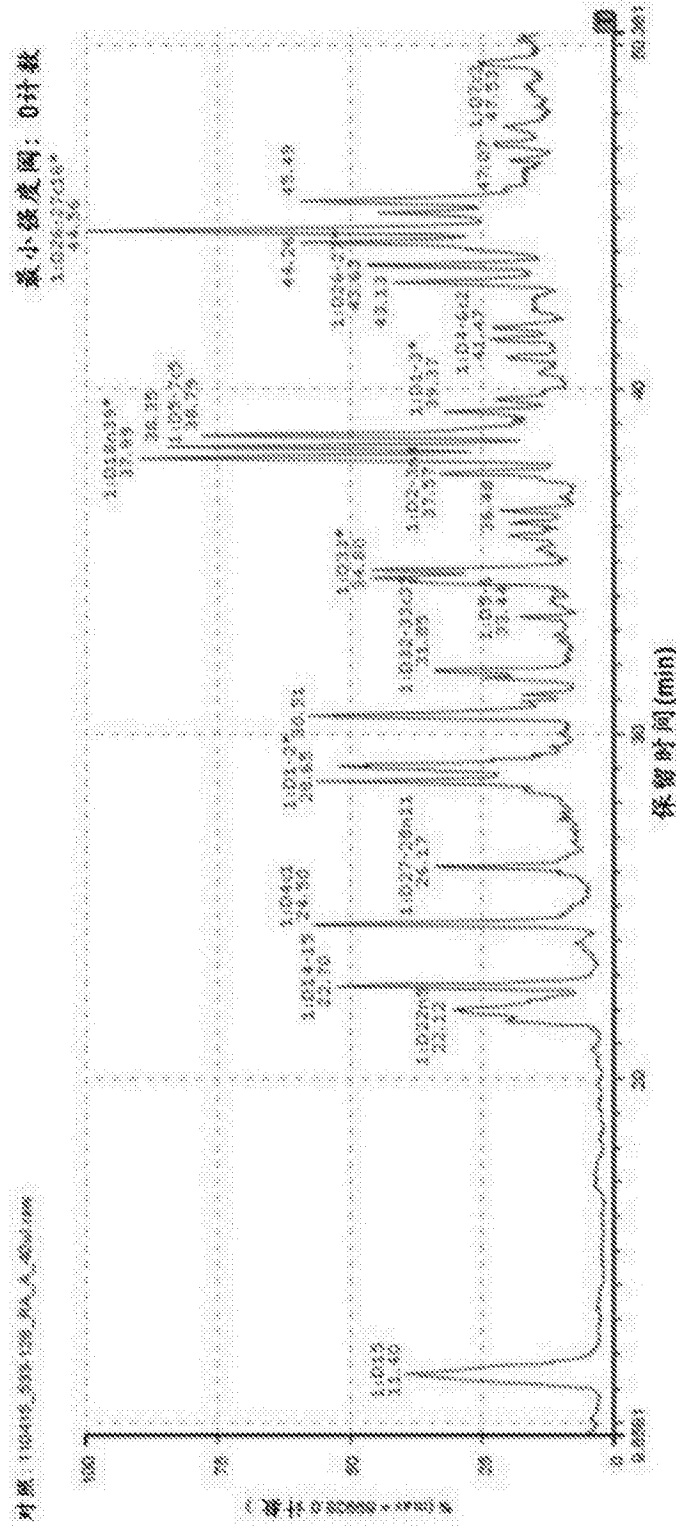


图17C



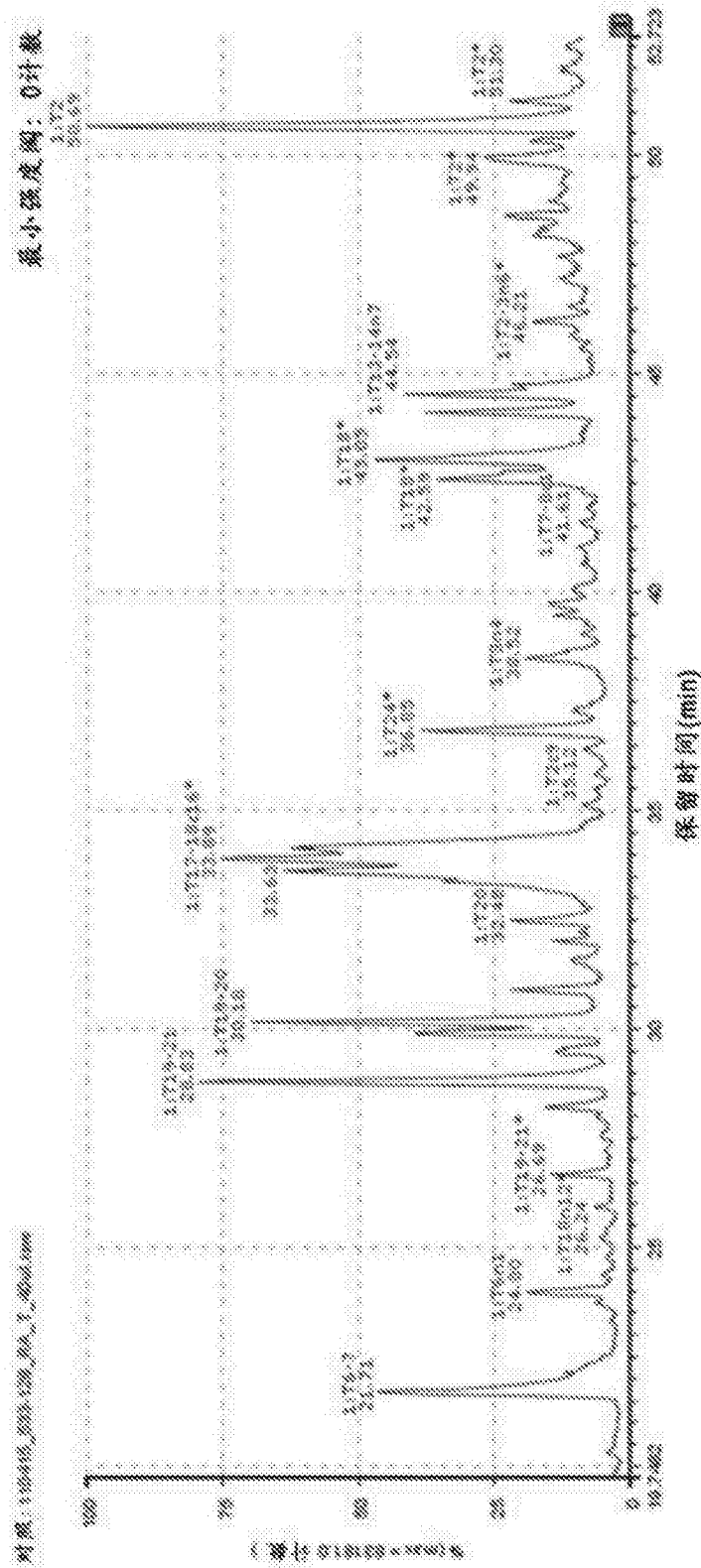


图17D

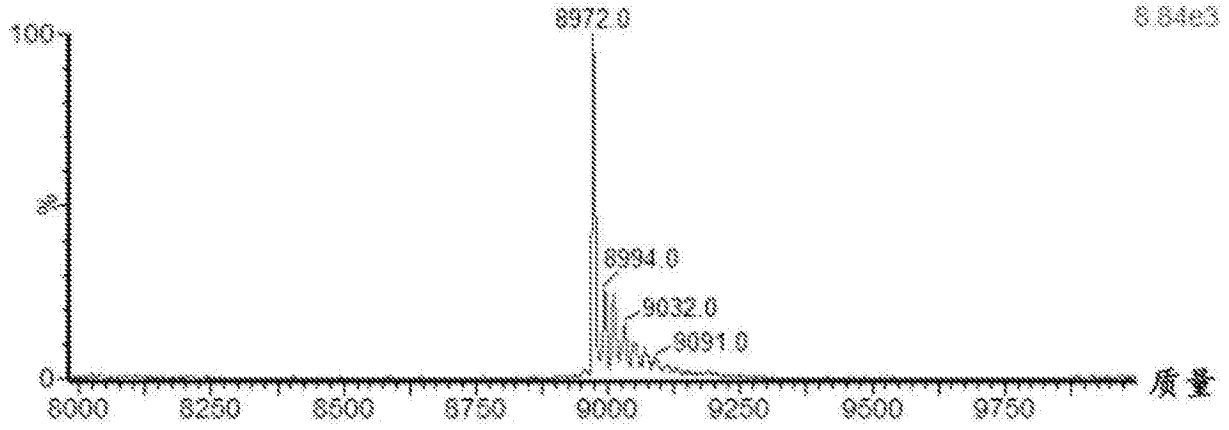


图18A

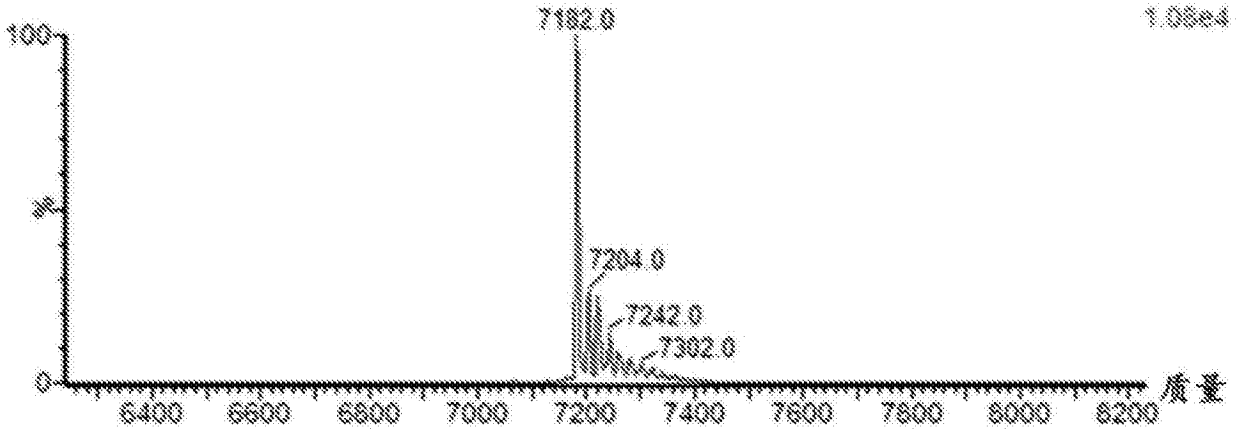


图18B

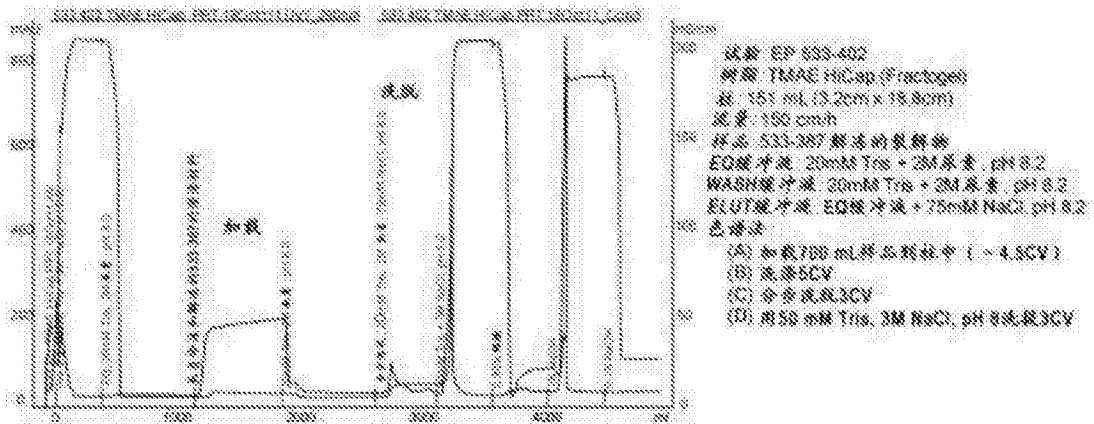


图19A

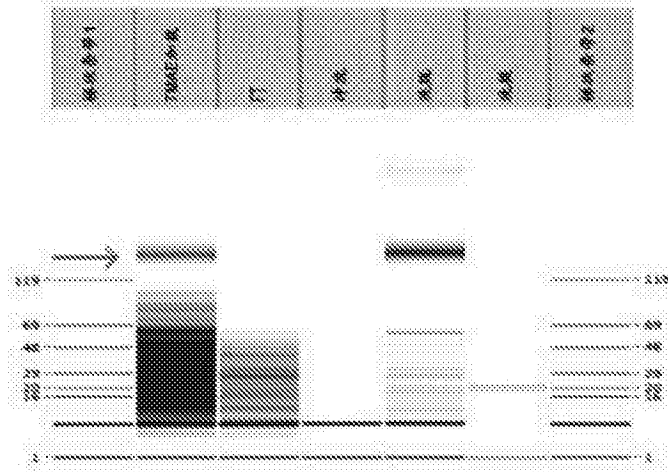


图19B

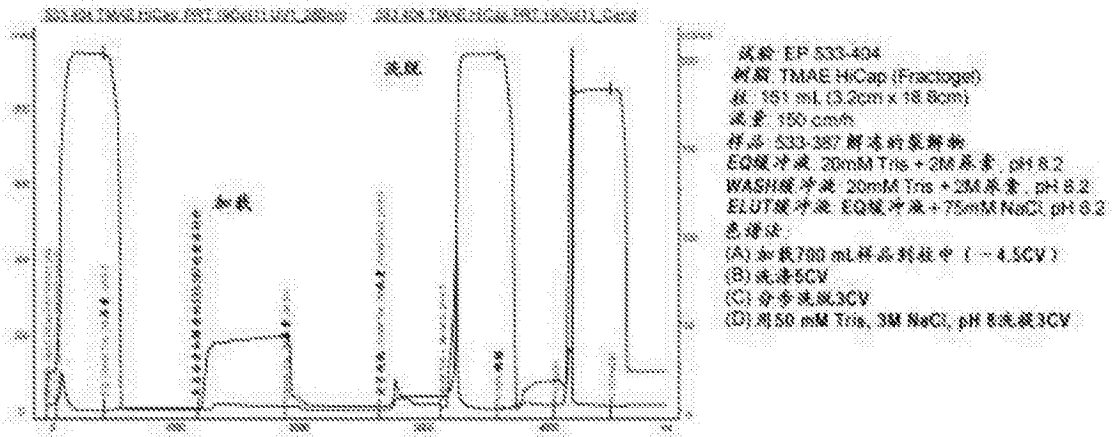


图20A

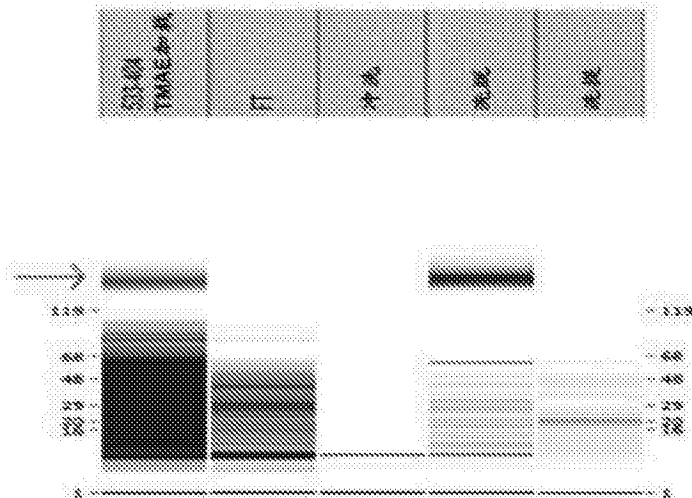


图20B

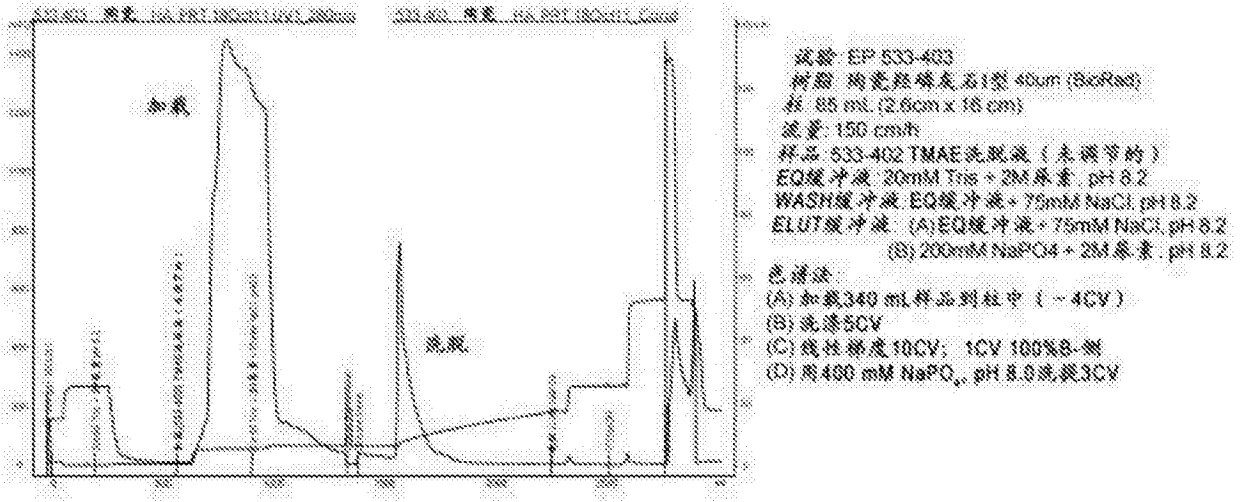


图21A

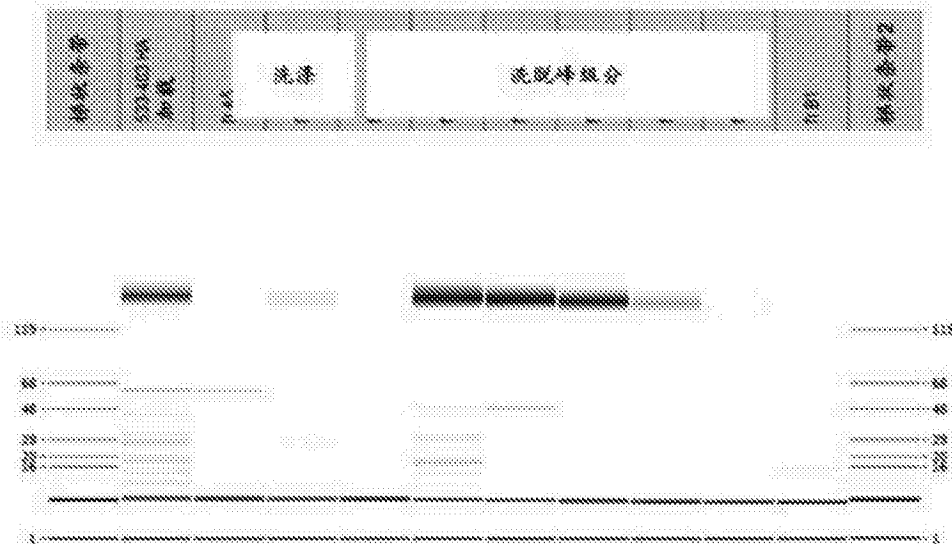


图21B

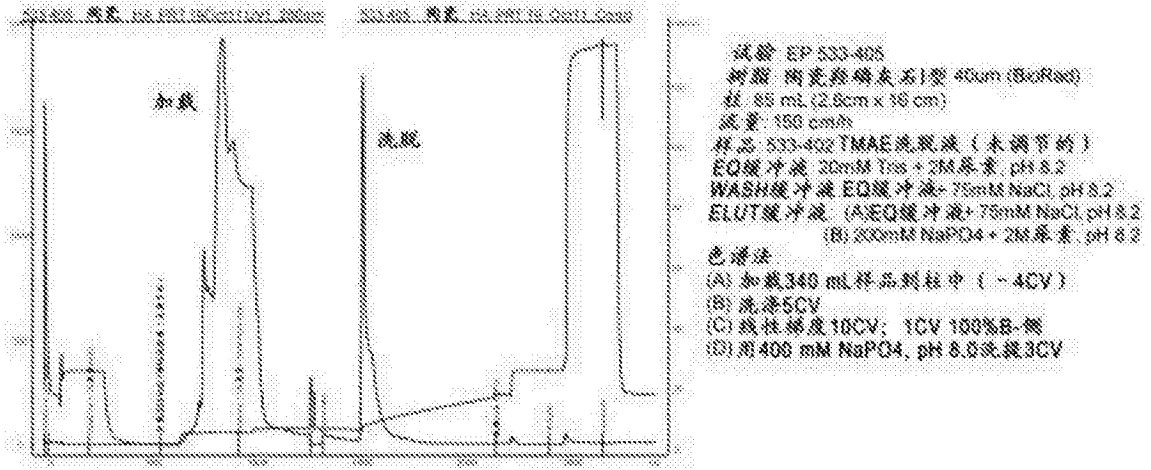


图22A

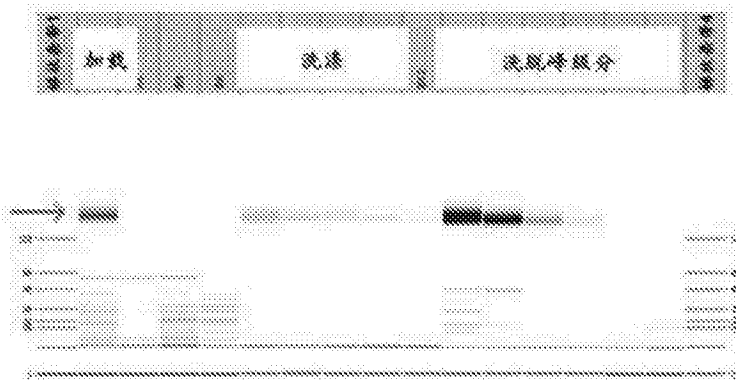


图22B

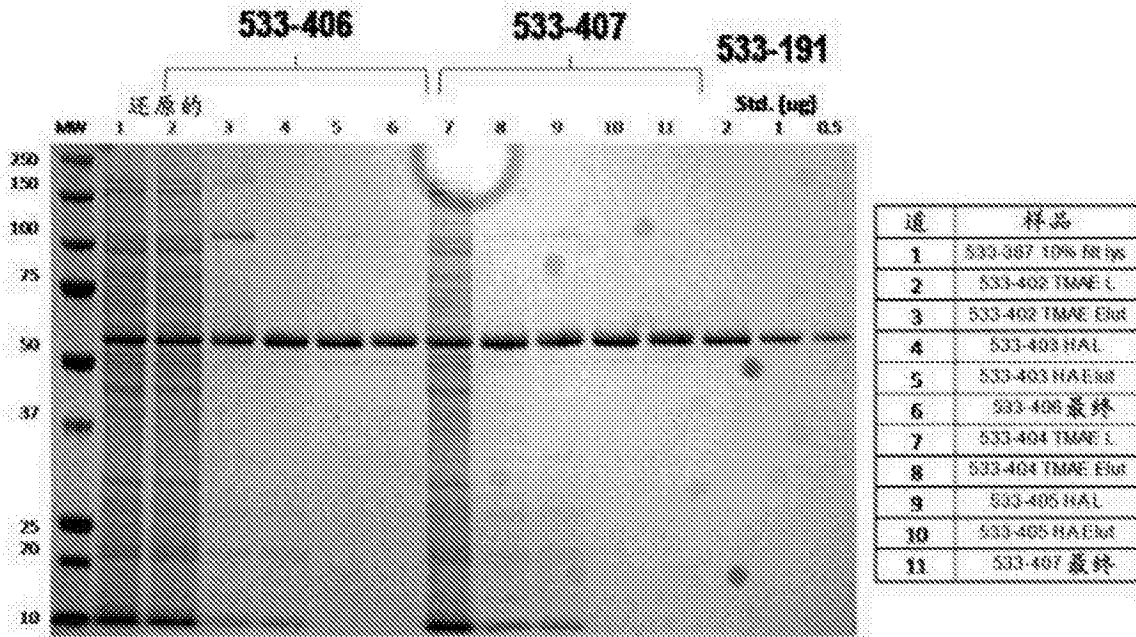


图23

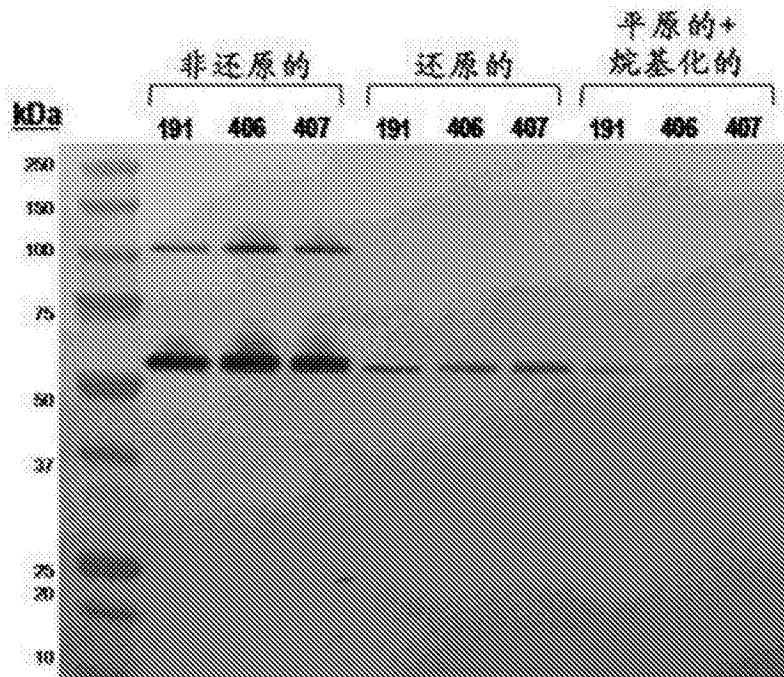


图24

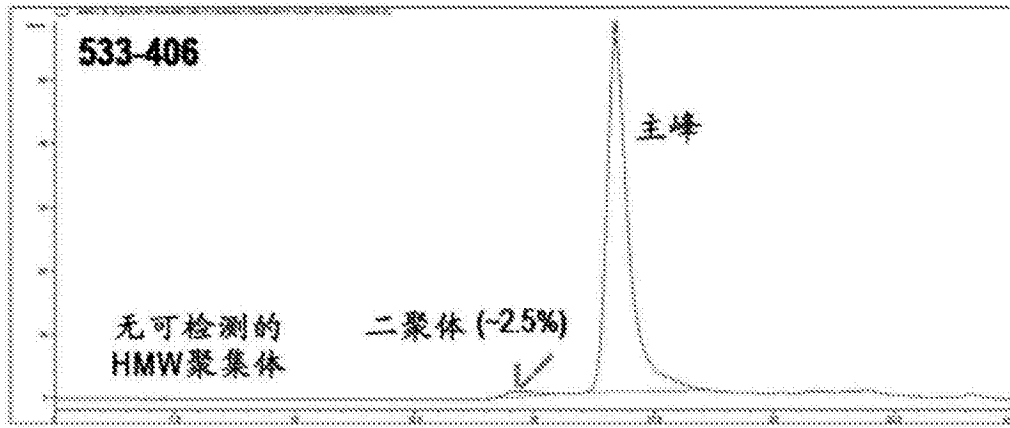


图25A

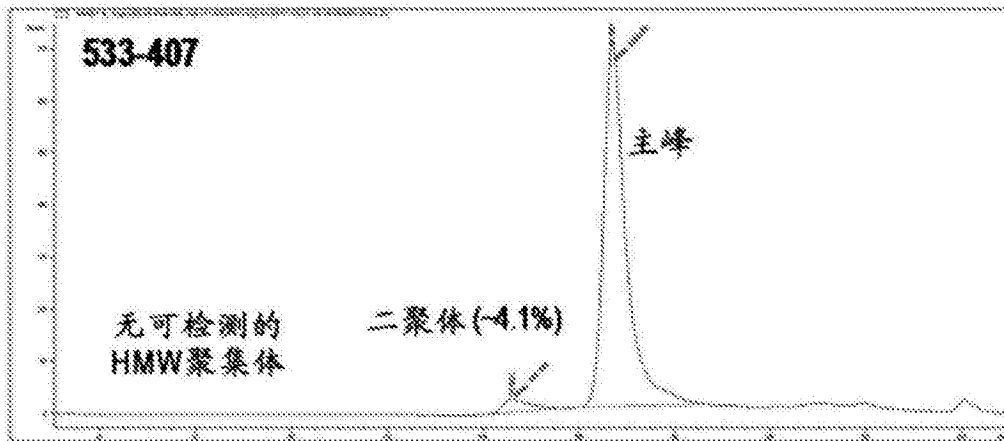


图25B

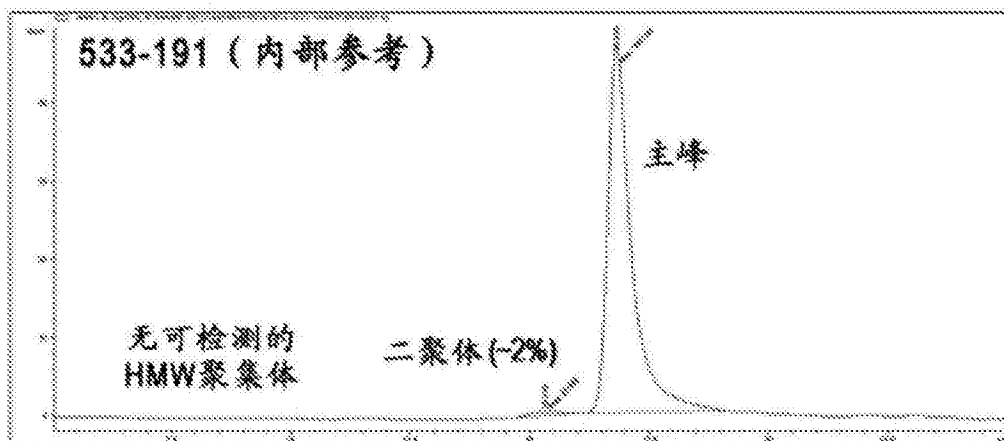


图25C

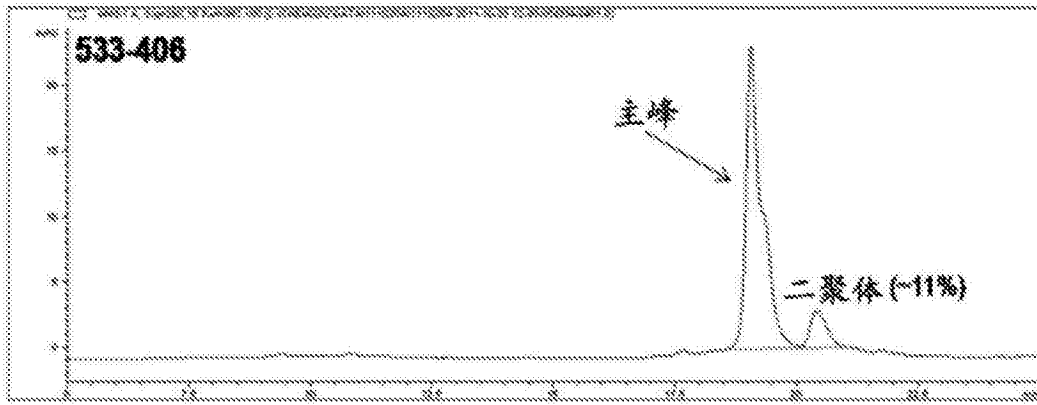


图26A

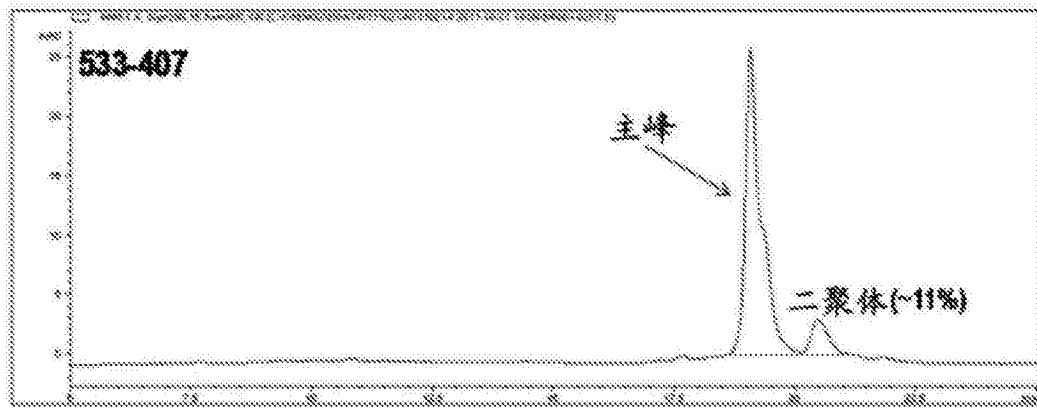


图26B

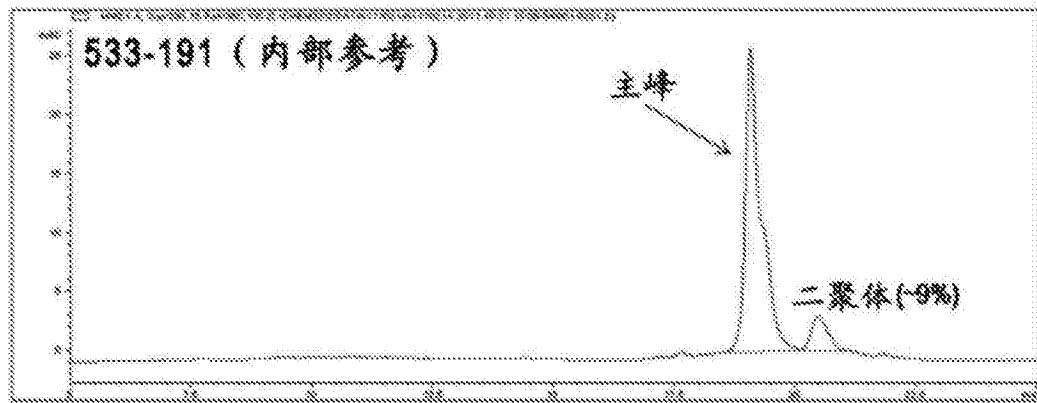


图26C



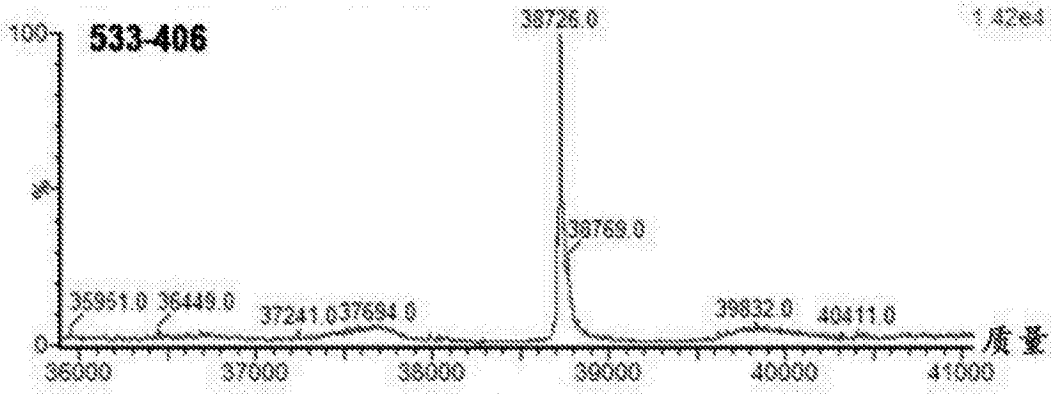


图27A

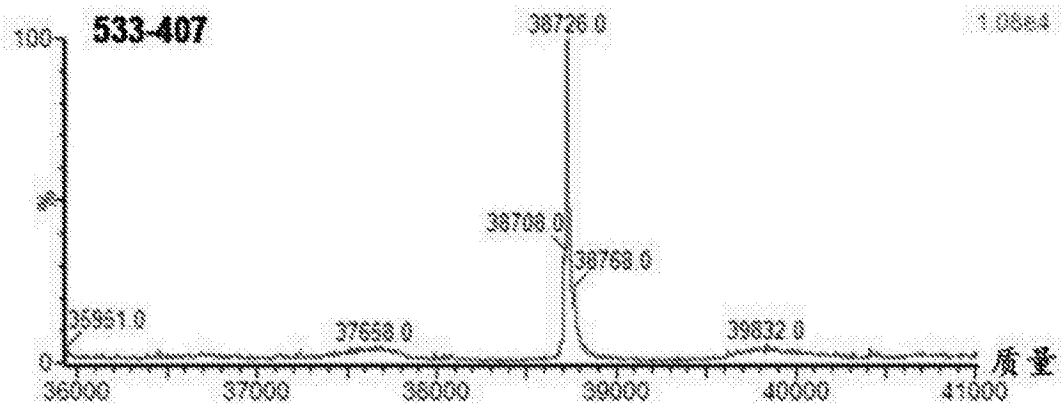


图27B

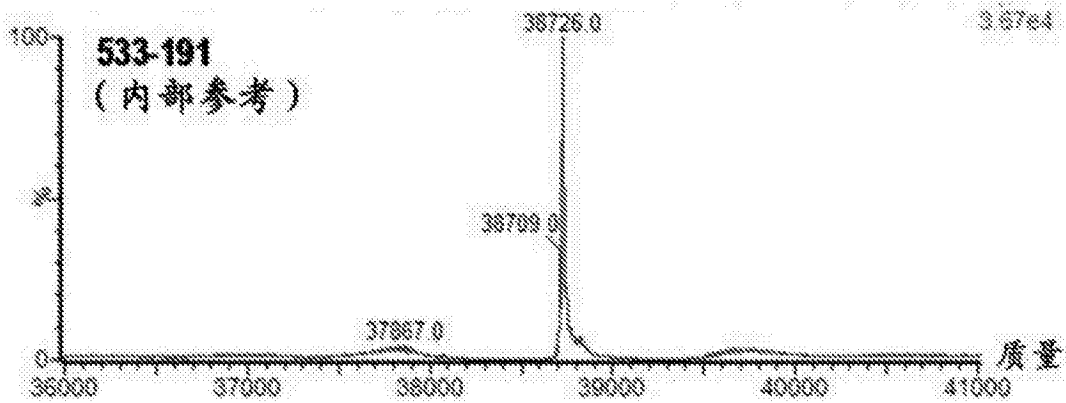


图27C

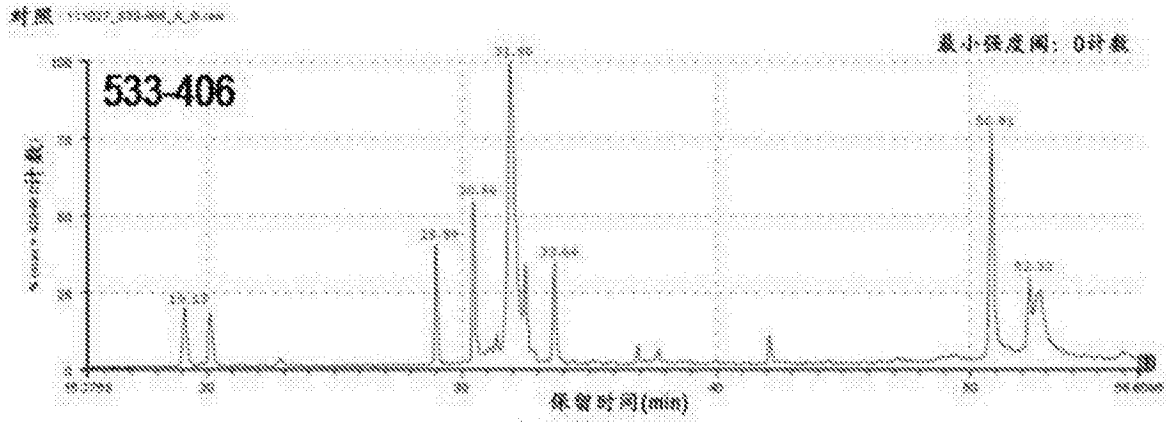


图28A

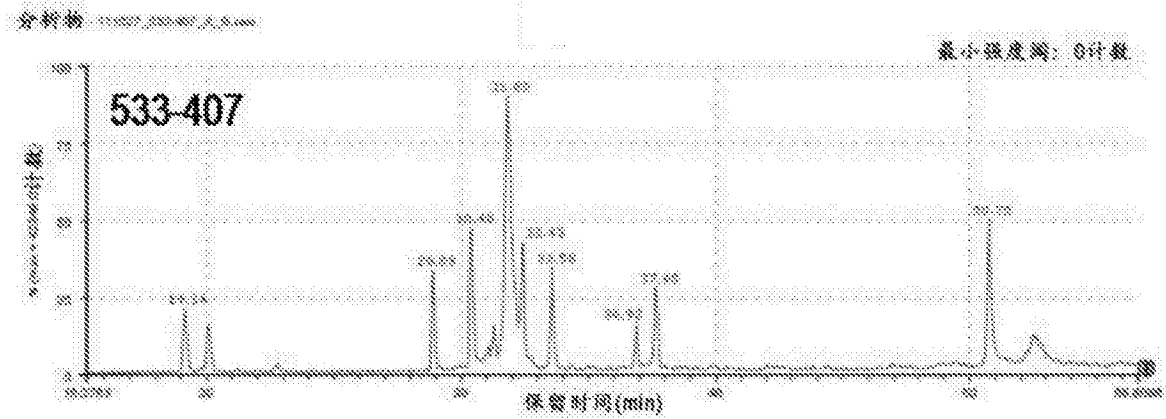


图28B

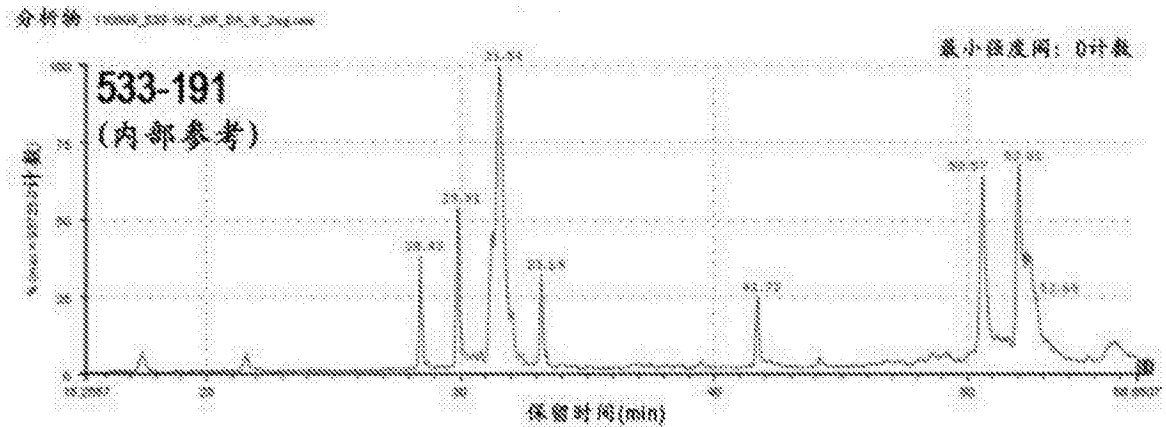


图28C

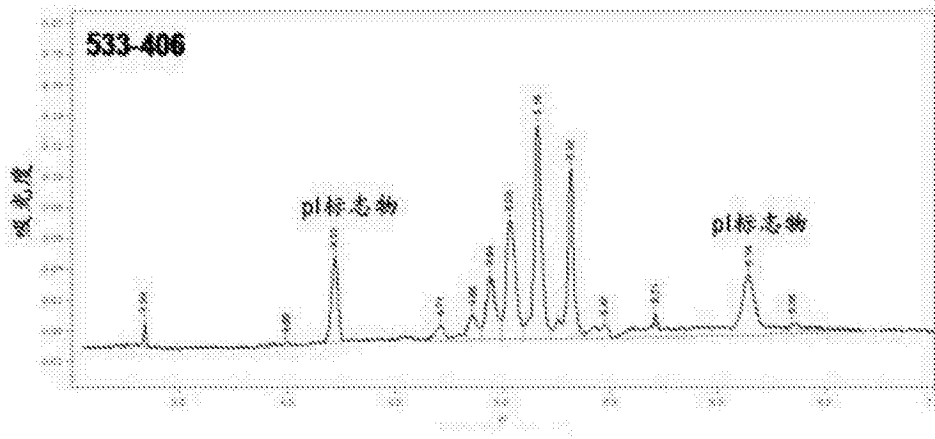


图29A

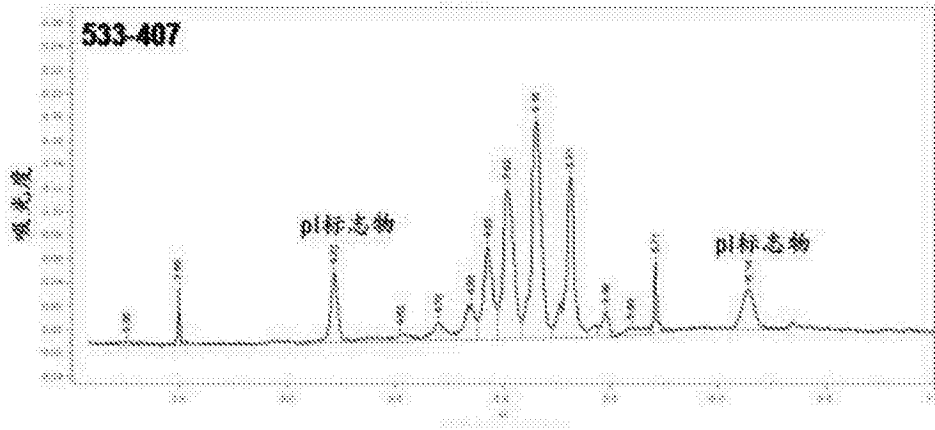


图29B

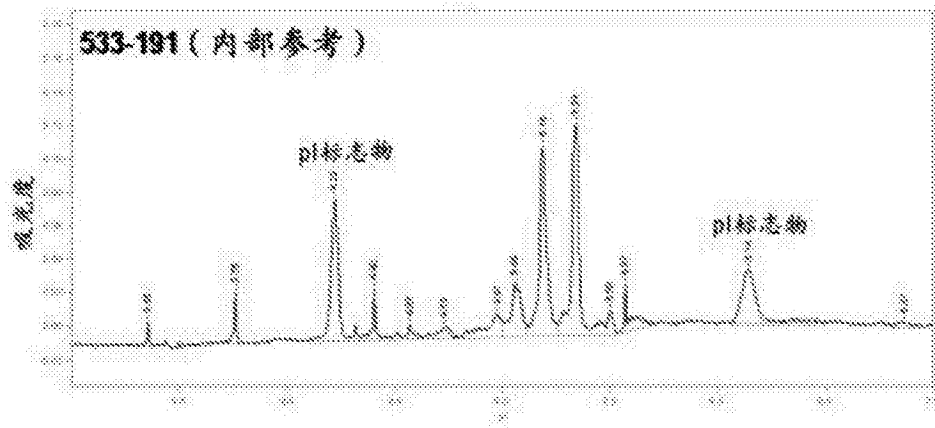


图29C

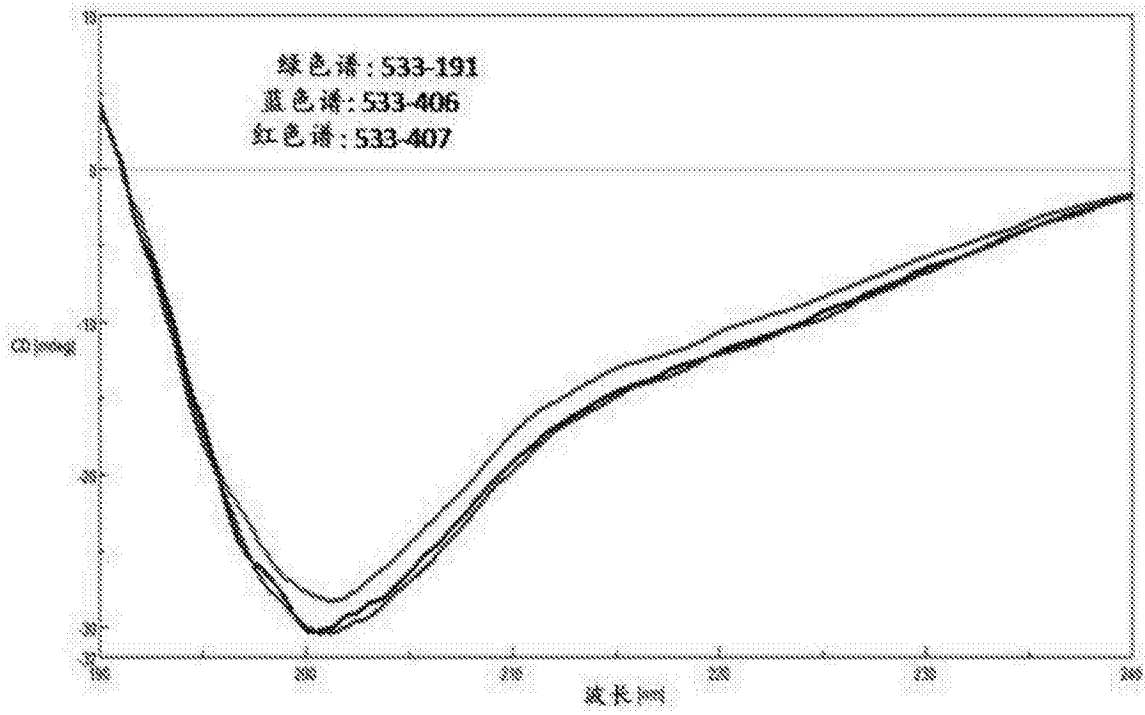


图30A

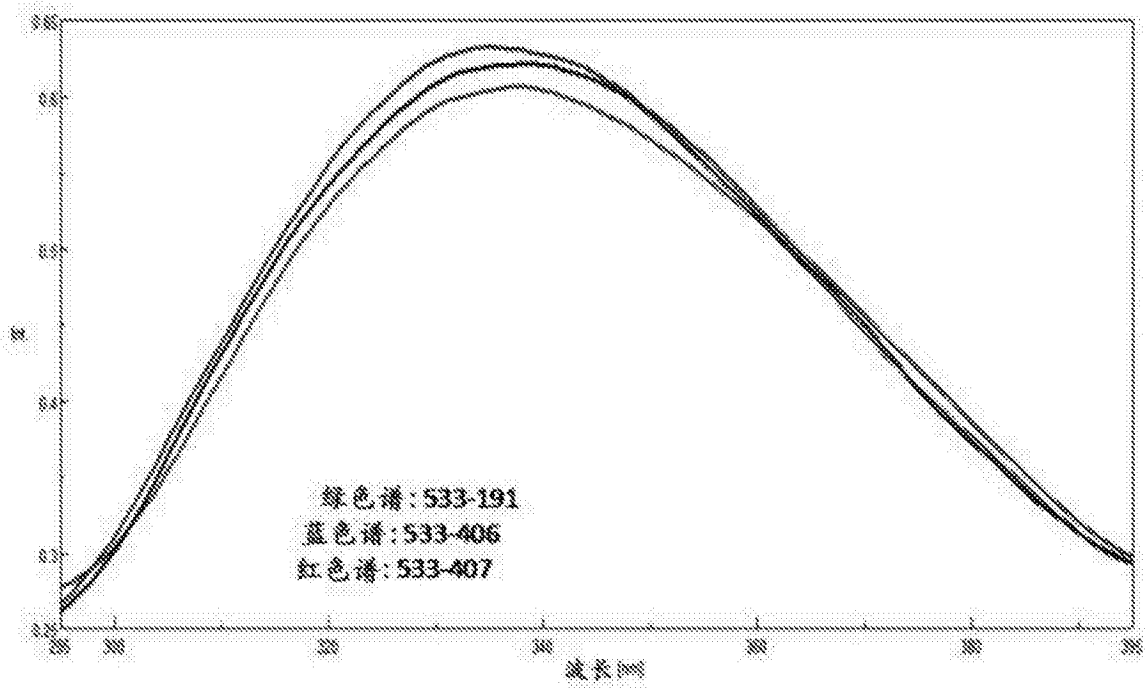


图30B

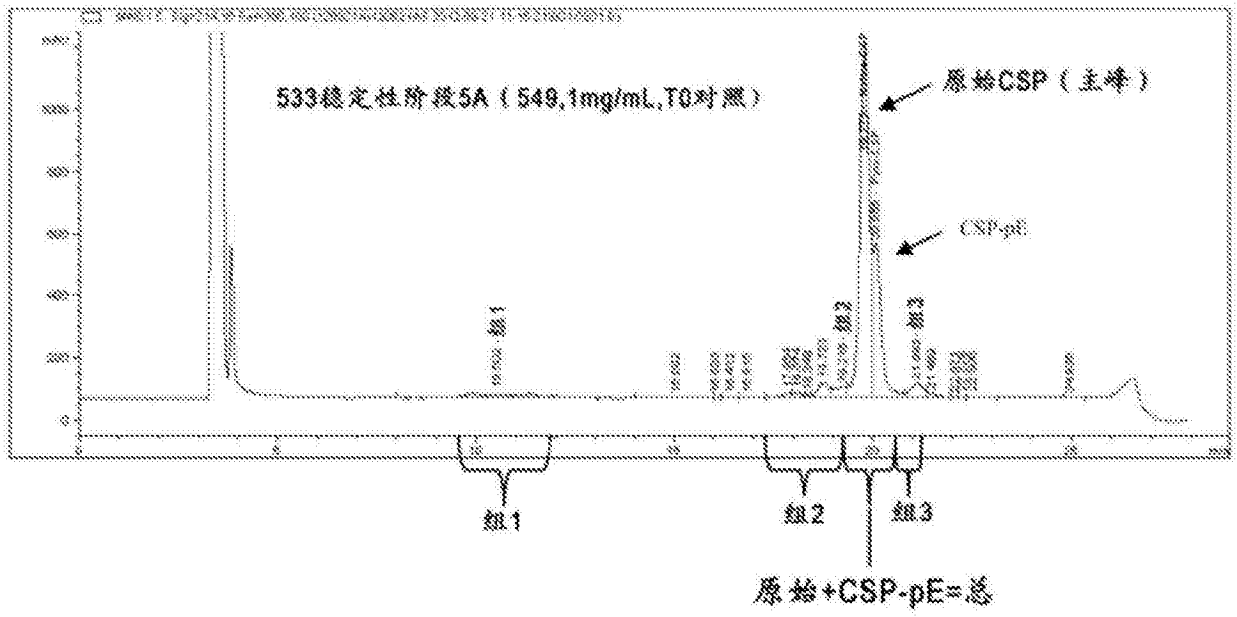


图31

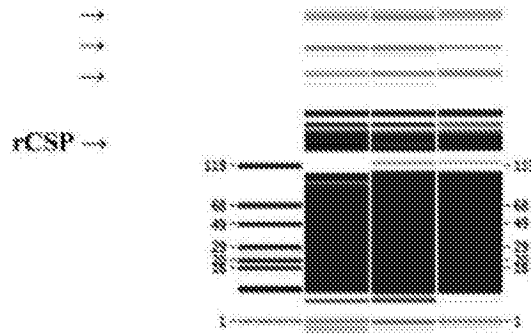


图32A

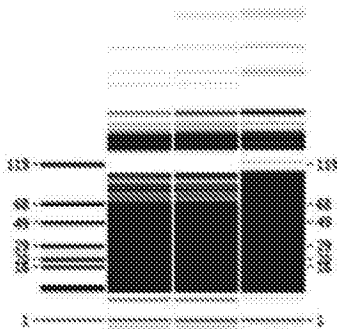


图32B

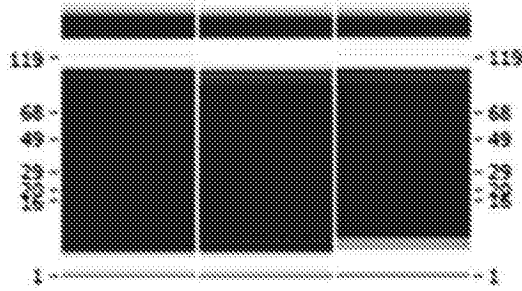


图32C