

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480020327.X

[51] Int. Cl.

G12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月23日

[11] 公开号 CN 1823169A

[22] 申请日 2004.5.14

[21] 申请号 200480020327.X

[30] 优先权

[32] 2003.5.15 [33] US [31] 10/440,475

[86] 国际申请 PCT/US2004/015100 2004.5.14

[87] 国际公布 WO2004/103292 英 2004.12.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.16

[71] 申请人 登德雷恩股份有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 克里斯廷·B·门多扎

约翰·利德尔 戴维·莫斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书4页 说明书31页 附图8页

[54] 发明名称

从线虫提取的抗凝蛋白(NAP)的制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种生产纯化的线虫提取的抗凝蛋白(NAP)的方法,其中通过权利要求中的方法生产的NAP是可以配制为NAP药物产品的NAP药物物质。本发明提供通过本文公开的方法生产的NAP药物物质和NAP药物产品。在一个实施方案中,本发明提供一种生产rNAPc2/脯氨酸药物物质和rNAPc2/脯氨酸药物产品的方法,并提供通过本文公开的方法生产的rNAPc2/脯氨酸药物物质。

1. 一种制备线虫提取的抗凝蛋白(NAP)药物物质的方法, 包括:
 - (a)发酵过程, 包括在合适的宿主内产生NAP, 其中将至少一种编码NAP
- 5 的序列整合入宿主的基因组;
- (b)回收过程, 包括从细胞和细胞碎片分离NAP;和
- (c)纯化过程, 包括纯化NAP药物物质去除杂质。
2. 权利要求1所述的方法, 其中所述纯化过程进一步包括将NAP物质引入最终药物配制品。
- 10 3. 权利要求2所述的方法, 进一步包括填充过程以制备NAP药物产品。
4. 权利要求1所述的方法, 其中NAP选自以下物质组成的组: rNAPc2, rNAPc2/脯氨酸, AcaNAP5, AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或AcaNAP46。
- 15 5. 权利要求1所述的方法, 其中NAP是rNAPc2/脯氨酸。
6. 权利要求2所述的方法, 其中NAP选自以下物质组成的组: rNAPc2(AcaNAPc2), rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸), AcaNAP5, AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或AcaNAP46。
- 20 7. 权利要求2所述的方法, 其中NAP是rNAPc2/脯氨酸。
8. 权利要求1所述的方法, 其中所述宿主是巴氏毕赤酵母。
9. 权利要求1所述的方法, 其中所述发酵过程包括其中的宿主细胞生长至所需细胞密度的种子发酵过程和其中NAP产生至所需效价的生产发酵过程。
- 25 10. 权利要求9所述的方法, 其中所述生产发酵过程包括甘油分批发酵, 甘油补料分批发酵, 甲醇适应发酵, 和甲醇诱导发酵。
11. 权利要求10所述的方法, 进一步包括在甲醇适应发酵和甲醇诱导发酵期间, 控制发酵的pH值范围在约 2.9 ± 0.1 pH值单位。
12. 权利要求10所述的方法, 进一步包括控制发酵的温度。

13. 权利要求12所述的方法, 包括在发酵的甲醇适应阶段的大约第一个4小时, 维持温度在约 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 且甲醇适应阶段的其余时间维持温度在约 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

14. 权利要求10所述的方法, 其中所述生产发酵进行达约七天, 其间NAP效价持续增加。

15. 权利要求1所述的方法, 其中所述回收过程包括膨胀床离子交换层析。

16. 权利要求15所述的方法, 包括Streamline SP XL离子交换树脂膨胀床层析。

17. 权利要求1所述的方法, 其中所述纯化过程包括疏水作用层析, 收集NAP级分, 对NAP级分的至少一次超滤/渗滤(UF/DF), 离子交换层析, 和收集得自离子交换层析的NAP级分。

18. 权利要求17所述的方法, 其中得自离子交换层析的NAP级分含有NAP药物物质。

19. 权利要求17所述的方法, 其中疏水作用层析包括使用Source 15PHE疏水作用层析介质, pH值约 3.0 ± 0.1 。

20. 权利要求17所述的方法, 其中离子交换层析包括使用Source 15Q离子层析介质。

21. 权利要求17所述的方法, 进一步包括对得自离子交换层析的级分进行至少一次最终UF/DF。

22. 权利要求21所述的方法, 其中UF/DF将NAP药物物质交换入最终药物配制品缓冲液, 以产生NAP药物产品。

23. 权利要求3所述的方法, 其中所述填充过程包括粗过滤最终药物配制品中的NAP药物物质。

24. 权利要求23所述的方法, 进一步包括以剂量的形式分配NAP药物物质以制备NAP药物产品的填充步骤。

25. 权利要求24所述的方法, 其中所述填充过程进一步包括NAP药物产品的冻干。

26. 一种制备rNAPc2/脯氨酸药物物质的方法, 包括:

(a) 发酵过程, 其中rNAPc2/脯氨酸在具有整合入基因组的至少一种编码rNAPc2/脯氨酸的序列的巴氏毕赤酵母中产生, 包括使宿主细胞生长至所需

细胞密度的种子发酵，以及包括甘油分批发酵、甘油补料分批发酵、甲醇适应发酵和甲醇诱导发酵的达约七天的生产发酵过程；

(b)回收过程，包括用于从细胞和细胞碎片分离rNAPc2/脯氨酸的离子交换膨胀床层析；和

5 (c)纯化过程，包括使用疏水作用层析介质的疏水作用层析，收集rNAPc2/脯氨酸级分，对rNAPc2/脯氨酸级分的至少一次超滤/渗滤(UF/DF)，离子交换层析，和收集得自离子交换层析的rNAPc2/脯氨酸级分；

其中得自离子交换层析的rNAPc2/脯氨酸级分含有rNAPc2/脯氨酸药物物质。

10 27. 权利要求26所述的方法，进一步包括控制发酵的温度。

28. 权利要求27所述的方法，包括在甲醇适应发酵的约第一个4小时，维持温度在约 $28\pm 2^\circ\text{C}$ ，且甲醇适应发酵的其余时间维持温度在约 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 。

29. 权利要求26所述的方法，包括在甲醇适应发酵和甲醇诱导发酵期间维持pH值在约 2.9 ± 0.1 。

15 30. 权利要求26所述的方法，包括在pH值约 3.2 ± 0.2 进行Streamline SP XL离子交换树脂膨胀床层析。

31. 权利要求26所述的方法，包括在约pH值 3.0 ± 0.1 进行Source 15PHE疏水作用层析。

32. 权利要求26所述的方法，包括Source 15Q离子层析。

20 33. 权利要求26所述的方法，进一步包括对得自离子交换层析的级分进行至少一次最终UF/DF。

34. 一种制备rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的方法，包括权利要求26所述的方法，并进一步包括将rNAPc2/脯氨酸药物物质引入最终药物配制品，包括粗过滤最终药物配制品中的rNAPc2/脯氨酸药物物质的填充过程，和包
25 括以剂量的形式将rNAPc2/脯氨酸分配入容器以制备rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的填充步骤。

35. 一种制备rNAPc2/脯氨酸冻干药物产品的方法，包括权利要求34所述的方法，并进一步包括容器内rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的冻干。

36. 通过权利要求1所述的方法制备的NAP药物物质。

30 37. 权利要求36所述的NAP药物物质，其中NAP选自：
rNAPc2(AcaNAPc2)，rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸)，AcaNAP5，

AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或AcaNAP46。

38. 权利要求37所述的NAP药物物质, 其中NAP是rNAPc2/脯氨酸。

39. 通过权利要求2所述的方法制备的NAP药物产品。

5 40. 权利要求39所述的NAP药物产品, 其中NAP选自:
rNAPc2(AcaNAPc2), rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸), AcaNAP5,
AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5,
AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或AcaNAP46。

41. 权利要求40所述的NAP药物产品, 其中NAP是rNAPc2/脯氨酸。

10 42. 权利要求26所述的rNAPc2/脯氨酸药物物质。

43. 权利要求34所述的rNAPc2/脯氨酸液体药物产品。

44. 权利要求35所述的rNAPc2/脯氨酸冻干药物产品。

从线虫提取的抗凝蛋白(NAP)的制备方法

5 相关申请

本申请权利要求享受2003年5月6日提交的共同未决申请“使用VIIa因子/组织因子抑制剂治疗出血性疾病的方法(“Method of Treatment of Hemorrhagic Disease Using a Factor VIIa/Tissue Factor Inhibitor”)的优先权。

10 技术领域

本发明涉及一种制备人血浆中的抗凝血蛋白质的方法以及由此方法制备的蛋白质。具体地，本发明涉及制备纯化的从线虫提取的(Nematode-extracted)抗凝蛋白(NAP)的方法，并涉及由此方法制备的纯化的NAP。具体是，本发明涉及NAP药物物质和NAP药物产品及其制备方法。

15

背景技术

可以在研究试验室中发现并纯化具有潜在药物价值的治疗性蛋白质，其使用的原料和方法不适于药物产品的大规模工业生产。为了以工业规模制备药物产品，生物工艺生产设备必须是坚固的和可扩大的，且不损害产品质量(Gottschalk, 2003, BioProcess Intl 1(4):54-61)。药剂的生产过程必须提供有成本效益的方法，增加的产品产率，足以满足需求的能力，并且理想地，应该达到适应需求变化的可放大性。治疗性蛋白质的生产过程必须开发生产大量功能型蛋白质的有成本效益的方法，以及纯化该蛋白质以产生具有适于目的用途的适宜纯度的药剂的方法。

20

蛋白质纯化的“研究规模”方法，亦称为“实验室规模”或“实验台规模(bench-scale)”方法，通常与发现和鉴定该治疗性蛋白质的方法紧密相关。通常，仅为微克或毫克级的纯化的蛋白质的产率对于鉴定和测序该蛋白质是足够的。即使已经建立了重组生产治疗性蛋白质的表达系统之后，上述表达系统也不一定适于以工业规模生产蛋白质。此外，研究规模的纯化方法使用有机溶剂，强酸，或其它对工业化规模来说是不需要的或不实用的且有时在生产药剂时不允许的试剂。进一步地，上述纯化方法使用诸

25

30

如分子筛分离或高效液相层析(HPLC)等在实验室中有效的纯化方法，但上述方法不容易放大至工业化生产水平。

中试规模方法(pilot scale process)，例如表达治疗性蛋白质的宿主细胞的10L至100L体积的发酵，适于进一步研究生产工艺或生产用于早期临床研究的足量治疗性蛋白质，但是即使中试规模方法也并不总是可以扩大至后期临床研究所需的生产量。

增加生物技术生产能力的一种途径涉及增加微生物表达系统的生产能力或效率。现有各种公认的生物“工厂”可以用于生产治疗性蛋白质。然而，由于功能蛋白的生产与产生该蛋白质的生物体的细胞机制密切相关，因此取决于要生产的蛋白质，每种表达系统用于大规模生产药物产品时都具有优点和缺点。大肠杆菌由于易于操纵，生长迅速，需要廉价的生长培养基，且可以将蛋白质分泌入培养基中以利于回收，因此是被选择用于表达许多蛋白质的“工厂”。然而，大肠杆菌中产生的许多真核蛋白质是以非功能性、不完整的形式产生的，缺少糖基化或其它翻译后修饰以及具有合适的二硫键和三维折叠的蛋白质的形成。此外，大肠杆菌中产生的物质具有内毒素污染。使用芽孢杆菌属的种作为表达系统时经常受到相似的制约。哺乳动物细胞培养系统产生少量的具有正确糖基化和折叠的真核蛋白质，但是哺乳动物细胞培养系统昂贵，难以扩大至工业生产水平，不稳定，并且需要使用动物血清。昆虫细胞表达系统快速，相对便于开发，并且具有哺乳动物蛋白质的良好表达水平，但是昂贵，仅仅可以适当放大，并且产生不适当的糖基化。酵母表达系统由于其易于生长，快速并且可以放大而受欢迎。然而，某些酵母表达系统产生不稳定的结果，并且有时难以达到高产率。

一种很有前景的酵母表达系统是甲醇营养型巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。与其它真核表达系统相比，毕赤氏酵母属具有许多优越性，这是由于其不存在与细菌相关的内毒素问题，也不存在动物细胞培养物中产生的蛋白质的病毒污染问题(Cino, Am Biotech Lab, May 1999)。毕赤氏酵母属在不存在葡萄糖的情况下利用甲醇作为碳源，使用甲醇诱导型醇氧化酶(AOX1)启动子作为甲醇诱导型启动子驱动异源蛋白质表达，所述启动子通常控制酶AOX1的表达，所述酶催化甲醇代谢中的第一步。毕赤氏酵母属大量繁殖性生长率使其易于扩大至大规模生产，但扩大规模面临的挑战包括

pH控制,氧的限制,营养限制,温度波动,和使用甲醇的安全考虑(Gottschalk, 2003, BioProcess Intl 1(4):54-61; Cino Am Biotech Lab, May 1999)。使用巴氏毕赤酵母根据目前的优良生产规范(good Manufacturing Practice)(cGMP)条件进行生产是可行的,其规模为1000L的发酵(Gottschalk, 2003, BioProcess Intl 1(4):54-61)。

另一种增加生物技术生产能力的途径是改善蛋白质回收和发酵产品的下游处理(downstream processing)。在下游处理过程中,该过程必须是可调节的,以适应发酵效价,培养基组成,和细胞存活力的改变和改善,同时对现有能力的产率进行最大化(Gottschalk, 2003, BioProcess Intl 1(4):54-61)。

10 层析法和过滤技术的新发展显著增加了选择性,回收率,并且具有高通量和低循环时间以适应当前的补料分批发酵方法的大体积和高表达水平(Gottschalk, 2003, BioProcess Intl 1(4):54-61)。

15 尽管生物技术生产产生了巨大进步,并不存在适于每种蛋白质的普遍性解决方案。具体的治疗性蛋白质的生产方法需要针对该蛋白质或蛋白质家族具体问题的新颖的和创新的解决方法。同样地,成功的工业应用通常依赖于该蛋白质或蛋白质家族的具体性质和用于生产作为药物产品的该蛋白质或蛋白质家族的生产方法的结合。

发明概述

20 本发明提供一种生产纯化的从线虫提取的抗凝蛋白(NAP)的方法,和由此方法生产的纯化的NAP药物物质和NAP药物产品。本发明提供一种生产大量(工业规模)NAP药物物质和NAP药物产品的方法。具体地,本发明提供一种生产NAP药物物质的方法,包括下列步骤:(a)发酵过程,包含在合适的宿主中产生NAP,其中至少一种编码NAP的序列被整合入该宿主的基因组中; (b)回收过程,其中从细胞和细胞碎片分离NAP; 和(c)纯化过程,其用于纯化NAP药物物质去除杂质。合适的宿主是巴氏毕赤酵母。本方法进一步包括将NAP药物物质引入最终药物配制品。本方法进一步包括:包含粗过滤最终药物配制品中的NAP药物物质的填充过程,以及以剂量的形式(dosage form)将NAP药物物质分配在最终药物配制品中以生成NAP药物产
25 品的填充步骤,和进一步冻干NAP药物产品。本文提供的方法可以用于由rNAPc2(AcaNAPc2), rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸), AcaNAP5,

AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或AcaNAP46 生产纯化的NAP药物物质或NAP药物产品。

本发明提供通过本文公开的方法生产的 NAP 药物物质。本发明提供使用 NAP 生产的 NAP 药物物质, 所述 NAP 选自, 但不限于, rNAPc2(AcaNAPc2), rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸), AcaNAP5, AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或 AcaNAP46。在一个实施方案中, 可以使用 rNAPc2/脯氨酸生产本发明的 NAP 药物物质。本发明进一步提供通过本文公开的方法生产的 NAP 药物产品。本发明提供使用 NAP 生产的 NAP 药物产品, 所述 NAP 选自, 但不限于, rNAPc2(AcaNAPc2), rNAPc2/脯氨酸(AcaNAPc2/脯氨酸), AcaNAP5, AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42, AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25, AcaNAP44, 或 AcaNAP46。在一个实施方案中, 使用 rNAPc2/脯氨酸生产本发明的 NAP 药物物质。

根据另一方面, 本发明提供一种生产 rNAPc2/脯氨酸药物物质和 rNAPc2/脯氨酸药物产品的方法。本发明进一步提供通过本文公开的方法生产的 rNAPc2/脯氨酸药物物质和 rNAPc2/脯氨酸药物产品。具体是, 本发明提供一种生产 rNAPc2/脯氨酸药物物质的方法, 包括发酵过程, 回收过程, 和纯化过程。本文提供的方法包括发酵过程, 其中 rNAPc2/脯氨酸在具有整合入其基因组的至少一种编码 rNAPc2/脯氨酸的序列的巴氏毕赤酵母中产生, 其中发酵过程包括使宿主细胞生长至所需细胞密度的种子发酵和生产发酵过程, 生产发酵包括甘油分批发酵, 甘油补料分批发酵, 甲醇适应发酵, 和甲醇诱导发酵, 持续达约七天。本文提供的方法进一步提供一种包括离子交换膨胀床层析的回收过程, 用以从细胞和细胞碎片分离 rNAPc2/脯氨酸。本文提供的方法进一步提供一种纯化过程, 包括使用疏水作用层析介质的疏水作用层析, 收集 rNAPc2/脯氨酸级分, 对 rNAPc2/脯氨酸级分的至少一次超滤/渗滤(UF/DF), 离子交换层析, 和收集得自离子交换层析的 rNAPc2/脯氨酸级分, 其中得自离子交换层析的 rNAPc2/脯氨酸级分含有 rNAPc2/脯氨酸药物物质。根据本发明的一方面, 本方法包括控制发酵温度, 具体是在甲醇适应发酵的第一个 4 小时维持温度在大约 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 甲醇适应

5 发酵的其余阶段维持在大约 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 。根据本发明另一方面，在甲醇适应发酵和甲醇诱导发酵期间 pH 值维持在约 2.9 ± 0.1 。在一个实施方案中，回收过程包括 pH 值约 3.2 ± 0.2 的 Streamline SP XL 离子交换树脂膨胀床层析，且纯化步骤包括 pH 值约 3.0 ± 0.1 的 Source 15PHE 疏水作用层析，和 Source 15Q 离子层析，继之以对得自离子交换层析的 NAP 级分的 UF/DF。

10 进一步提供一种生产 rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的方法，包括通过如上所述的方法生产 rNAPc2/脯氨酸药物物质，然后将 rNAPc2/脯氨酸药物物质引入最终的药物配制品，包括粗过滤的填充过程和包括将 rNAPc2/脯氨酸分配至最终剂型的填充步骤，例如分散入容器或小瓶以形成 rNAPc2/脯氨酸液体药物产品，且可以进一步包括冻干 rNAPc2/脯氨酸药物产品。本发明提供通过该方法生产的 rNAPc2/脯氨酸液体药物产品和通过该方法生产的 rNAPc2/脯氨酸冻干药物产品。

15 本发明提供一种生产大量(工业规模)NAP 药物物质，具体是 rNAPc2/脯氨酸药物物质的方法。通过本文提供的方法生产的 NAP 药物物质可以作为 NAP 药物产品进行配制并分配，所述 NAP 药物产品包括液体 NAP 药物产品或冻干 NAP 药物产品。此外，通过本文提供的方法生产的 rNAPc2/脯氨酸药物物质可以作为 rNAPc2/脯氨酸药物产品进行配制并分配，所述产品包括液体 rNAPc2/脯氨酸药物产品或冻干 rNAPc2/脯氨酸药物产品。

20 本方法适于有效地大规模生产具有所需活性水平和纯度的 NAP 药物物质和 NAP 药物产品。相比之下，此前公开的纯化 NAP 的方法是研究规模的方法，无法扩大至大规模 NAP 生产，并且使用在生产药物物质和药物产品时不希望的试剂和原料。例如，一种此前公开的回收过程包括离心以去除细胞。在此前的方法中，然后通过阳离子交换层析，凝胶过滤层析(亦称为分子筛分离)，和最后的反相层析来纯化上清液。然而，如此处公开，NAP，
25 具体是 rNAPc2/脯氨酸的性质使改进研究规模方法以用一种可扩大的和可清洁的方法代替离心步骤成为可能，以避免难以扩大的凝胶过滤层析步骤以及使用易燃有机溶剂和专用设备的反向高压液相层析(RP-HPLC)步骤，并且改善最终产物的纯度。此处提供的方法中，膨胀床离子交换层析步骤，具体是 Streamline SP XL 膨胀床层析步骤，避免了通常用于工业化生产回收
30 步骤的多个单元操作(例如，微量过滤和超滤的组合)。如此处公开，Streamline SP XL 步骤用来从细胞碎片分离 rNAPc2/脯氨酸，并且将产品交

换入适于第一步纯化步骤的缓冲液。虽然之前公开的方法使用凝胶过滤和反相层析,本发明中这些柱层析步骤被疏水作用层析(HIC)和阴离子交换层析代替,具体是使用 Source 15PHE 的 HIC 和使用 Source 15Q 的阴离子交换,其通过去除蛋白和非蛋白杂质导致 rNAPc2/脯氨酸的显著纯化。似乎
5 rNAPc2/脯氨酸以及其它 NAP 相对较低的 pI 值($pI = 4.1$)与产生以下令人吃惊的结果有关:得自 HIC 步骤的产品与基质的结合率更高且总回收率更高取决于在约 3.2 的低 pH 值条件下进行上述层析步骤。此外,生产效率是在大约 pH 值 3 进行所述步骤(从后面的发酵步骤开始直至 Streamline 层析和 HIC)的结果,其避免了上述步骤之间的缓冲液交换。

10

附图的简要说明

附图1.描绘了用于生产rNAPc2/脯氨酸的rNAPc2/脯氨酸巴氏毕赤酵母表达载体pYAM7sp8/rNAPc2/脯氨酸的载体图,显示参比点。

附图2A和2B描绘了发酵流程图,显示所用原料和试剂,所用方法和设备,以及对于发酵过程中的各步骤而言被控制和监测的条件;发酵从制备
15 种子摇瓶开始,从种子发酵持续到生产发酵。

附图3.描绘了回收流程图,显示所用原料和试剂,所用方法和设备,以及回收过程中被控制和监测的条件。

附图4A和4B描绘了纯化流程图,显示所用原料和试剂,所用方法和设备,以及纯化过程中被控制和监测的条件;纯化包括以下步骤:使用Source
20 15PHE进行的疏水作用-交换层析,超滤/渗滤步骤#1(UF/DF#1),使用Source 15Q进行的离子交换层析,最终UF/DF步骤,粗过滤,填充,和储存纯化产物。

附图5.描绘了液体药物产品流程图,显示所用原料和试剂,所用方法和设备,以及制备液体药物产品过程中被控制和监测的条件。上述方法包括
25 混合步骤,过滤和填充步骤,以及将装有液体药物产品的小瓶转移以进行储存。

附图 6.描绘了配制冻干的药物产品的流程图,显示所用原料和试剂,所用方法和设备,以及配制冻干药物产品过程中被控制和监测的条件。上述
30 方法包括 UF/DF 步骤,混合步骤,粗过滤和填充步骤,以及转移到冻干单元。

发明详述

本发明提供一种生产纯化的从线虫提取的抗凝蛋白(NAP)的方法, 诸如那些U. S.专利号(此后, “US”)5,863,894; 5,864,009; 5,866,542; 5,866,543; 5,872,098; 和5,945,275(每篇专利的全部内容掺入此处作为参考)公开的, 其中迄今为止鉴定的NAP具有抗凝血活性和/或丝氨酸蛋白酶活性。本发明提供通过权利要求所述的工艺方法生产的纯化的NAP, 其中上述纯化的NAP是可以配制为NAP药物产品的NAP药物物质。本发明具体适合于生产含有至少一个NAP结构域的多肽。本发明提供通过此处公开的方法生产的NAP药物物质和NAP药物产品。在一个实施方案中, 本发明提供生产rNAPc2/脯氨酸药物物质和rNAPc2/脯氨酸药物产品的方法, 以及提供通过此处公开的方法生产的rNAPc2/脯氨酸药物物质和rNAPc2/脯氨酸药物产品。

从线虫提取的抗凝蛋白(NAP)被如此命名是由于第一个NAP最初是从一种线虫, 犬齿钩虫(canine hookworm), *Ancylostoma caninum*中分离的。术语“NAP结构域”是指被认为具有抗凝血性质的一段序列。通常, NAP结构域是含有小于约120个氨基酸残基, 以及含有10个半胱氨酸残基的氨基酸序列, 如US 5,863,894; 5,864,009; 5,866,542; 5,866,543; 5,872,098; 和5,945,275中公开的。“NAP结构域”也可以指编码一个或多个具有NAP结构域的氨基酸序列或多肽的核酸或核苷酸序列。示例性的NAP结构域, NAP氨基酸序列, 广泛地定义的上述蛋白质家族的特征, 以及编码上述蛋白质的核酸分子公开于US 5,863,894; 5,864,009; 5,866,542; 5,866,543; 5,872,098; 和5,945,275。

本发明的NAP药物物质包括以抑制血液凝固, 包括血浆凝固为特征的抗凝剂。本发明的NAP药物物质具体包括, 那些增加人血浆凝固时间的NAP药物物质等, 所述增加如按凝血酶原时间(PT)和/或活化部分促凝血酶原激酶(thromoplastin)时间(aPTT)试验测定, 该药品如公开于US 5,863,894; 5,864,009; 5,866,542; 5,866,543; 5,872,098; 和5,945,275中的药品。本领域技术人员可以运用其它测定法来测定NAP药物物质的抗凝血活性。本领域技术人员同样也可以运用其它测定法来测定NAP药物物质的其它生物学活性。

术语“AcaNAPc2”或“rNAPc2”是指NAP家族的重组蛋白质。US 5,866,542描述了AcaNAPc2的制备和序列。

术语“AcaNAPc2/脯氨酸”，“AcaNAPc2P”，“rNAPc2/脯氨酸”和“rNAPc2/脯氨酸”是指具有AcaNAPc2氨基酸序列的重组蛋白质，所述氨基酸序列经过修饰以在AcaNAPc2序列的C末端增加脯氨酸残基。

“药物物质”或“活性药物成分”(API)是指可以随后与赋形剂配制在一起以生产药物产品的药学活性物质。药物物质可以是批量的(bulk form)。

“药物产品(drug product)”是指在最终配制缓冲液中含有药物物质的最终剂型(例如胶囊，片剂，瓶装液体制剂，瓶装冻干的粉末)，且通常含有无活性成分。药物产品可以是配制的药物物质。“赋形剂”是指有意添加至药物产品的无活性成分，其中应理解赋形剂在所用量情况下不具有药理学性质。

“杂质”是指药物物质，API配制品，或药物产品中存在的组分，其不是所需产品、产品相关物质或赋形剂，很清楚杂质可以是产品相关的或方法相关的。“降解产物”是指变体，具体是分子变体，由于光照，pH值，温度，水份，或与赋形剂或容器/包装/密闭系统反应而导致的药物物质或药物产品随时间的变化而产生。

“USP”是指美国药典(USP)和国家配方手册(NF)(United States Pharmacopeial Convention美国药典大会，Inc., Rockville Maryland(2002), "USP26- NF-21"，其全部内容掺入此处作为参考)，和USP对照标准(USP Reference Standards)中规定的标准。其它信息可以得自<http://www.usp.org>，或查阅USP-NF。

本发明提供产生高纯度NAP药物物质的方法，其中发酵或纯化步骤不使用动物来源的原料。本方法可以扩大化并且适合于以工业规模进行。本发明提供一种生产NAP药物物质和NAP药物产品的方法，所述方法包括发酵，回收，纯化，过滤，和填充过程。提供在合适的宿主中产生NAP的发酵过程，其中编码NAP的序列整合入该宿主的基因组中。提供回收过程，其改善从上述发酵步骤回收的蛋白质的产量和纯度，其中上述回收过程与更常规的方法诸如微量过滤和超滤相比，可以更有效地捕获NAP。提供纯化NAP药物物质去除杂质的纯化过程，其中所需的剂型通过联合使用包括但不限于超滤，渗滤，疏水作用层析和离子交换层析的方法来获得。提供可选择的填充过程，其中NAP药物产品被引入包装且可以被冻干。

本发明的方法适于生产 NAP 药物物质和 NAP 药物产品。本领域技术人员可以改进此处公开的方法以改善具体 NAP 药物物质的表达, 回收, 纯化, 配制, 或填充。在一个非限制性实施例中, 本领域技术人员可以测定感兴趣的具
5 体的具体 NAP 的等电点(pI), 并且可以对诸如层析法的结合容量或 pH 值等条件进行微小调整, 以改善所需的 NAP 药物物质的纯化。本发明提供如此
处公开自 NAP 纯化的 NAP 药物物质, 包括但不限于 AcaNAPc2, AcaNAPc2/
脯氨酸, AcaNAP5, AcaNAP6, AcaNAP23, AcaNAP31, AcaNAP42,
AcaNAP48, AceNAP5, AceNAP7, AduNAP4, AcaNAP24, AcaNAP25,
AcaNAP46, 和 AcaNAP44。具体地, 本发明提供 rNAPc2/脯氨酸。本领域
10 技术人员可以鉴定其它适用于此处公开的方法以生产纯化的 NAP 药物物质
的 NAP 蛋白质。

发酵

本发明提供一种发酵过程, 其中 NAP 在合适的宿主中产生。如本发明
15 提供, 一个或多个编码 NAP 的序列被整合入宿主基因组, 且上述宿主在发
酵过程期间产生 NAP。如此处提供, 在一个实施方案中, rNAPc2/脯氨酸作
为巴氏毕赤酵母分泌的蛋白质而在发酵过程中产生。

如此处提供, 发酵过程包括宿主细胞生长至所需细胞密度的种子发酵
过程和以所需效价产生 NAP 的生产发酵过程。种子发酵过程为生产发酵过
20 程提供合适密度的接种物以产生高水平 NAP。此处提供的发酵过程进一步
包括生产发酵以产生高水平 NAP。生产发酵包括不同的阶段: 甘油分批;
甘油补料分批; 甲醇适应; 和甲醇诱导。甘油分批阶段构建生物量。甘油
补料分批阶段中, 给培养物供应富集有甘油的溶液以增加生物量并抑制表
达。甲醇适应阶段中, 终止甘油补料并用诱导宿主产生 NAP 的甲醇补料所
25 代替。甲醇诱导阶段中, 维持甲醇适应阶段末的处理条件以保持 NAP 的产
生。

根据一方面, 控制发酵的 pH 值范围以获得所需的高效价 NAP。在一个
实施方案中, 在甲醇适应发酵和甲醇诱导发酵期间, 控制发酵的 pH 值范围
为约 2.9 ± 0.1 pH 值单位。根据另一方面, 控制发酵的温度。在一个实施方案
30 中, 发酵的甲醇适应阶段的温度在第一个 4 小时维持在约 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 以有助于成
功地适应甲醇补料, 且甲醇适应阶段其余时间的温度维持在约 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 以有

助于产生高效价的NAP。根据一方面，约七天中，NAP效价持续增加而对产品无不利影响，从而达到NAP的总体高产率。

在举例说明的实施方案中，在15L，100L，150L和1000L发酵罐中进行本文提供的发酵过程，并纯化得自15，100和150L发酵的物质以生产NAP药物物质。在一个实施方案中，发酵过程以高效价产生rNAPc2/脯氨酸。在各种实施方案中，在15L，100L，150L和1000L发酵罐中进行发酵以生产rNAPc2/脯氨酸，并已经纯化了得自15，100和150L发酵的rNAPc2/脯氨酸药物物质。

10 回收

本发明提供增加得自上述发酵步骤的NAP蛋白质的产量和纯度的回收过程。本文提供的回收过程允许捕获NAP和去除细胞和细胞碎片，其中本文提供的回收过程与更常规的诸如微量过滤(microfiltration)/超滤的方法相比更有效。不希望被该理论限制，本文提供的增加的回收效率源于上述毕赤氏酵母属系统各方面的综合，即巴氏毕赤酵母在发酵期间产生出稠的生物量。此外，NAP蛋白质是相对较小的蛋白质并且由此需要具有低通量率的小孔径尺寸超滤膜导致处理时间较长。根据一方面，回收过程使用离子交换层析，包括使用膨胀床离子交换层析单元(unit)以从细胞和细胞碎片分离NAP，并且将上述产品交换入适用于随后的纯化步骤的缓冲液。在一个实施方案中，如上所述使用Streamline SP XL离子交换树脂(Amersham Biosciences)膨胀床层析装置回收NAP药物物质。在另一个实施方案中，使用膨胀床层析从表达rNAPc2的宿主细胞的细胞碎片分离rNAPc2/脯氨酸，在一个特别优选的实施方案中，使用Streamline XL离子交换单元回收rNAPc2/脯氨酸。

可选择地，可以使用除膨胀床离子交换层析之外的其它方法进行从发酵步骤有效地捕获NAP的回收过程。本领域技术人员可以检验和评价用于捕获NAP和去除细胞和细胞碎片的其它方法，包括但不限于亲和层析，离心，过滤，示差沉淀，以及其它待定方法。

30 纯化

本发明提供一种纯化NAP药物物质去除杂质的纯化过程。如本文提供，纯化过程包括疏水作用层析，收集NAP级分，NAP级分的至少一次超滤和渗滤(UF/DF)，离子交换层析，收集得自离子交换层析的NAP级分，另一次UF/DF步骤，和最终过滤。应该理解，纯化过程提供的每个步骤都增加NAP
5 药物物质的纯度，以至本领域技术人员可以确定具体用途所需的纯净程度，并选择为达到NAP药物物质所需纯度水平必需的步骤和条件。通过从发酵液开始直至回收步骤和第一纯化步骤(Source 15PHE疏水作用层析)维持溶液在低pH值(约3)来增加全过程的效率。上述步骤具体地设计成能在相同pH
10 值下进行，以消除其它方法需要的pH/缓冲液交换步骤，由此降低所需的时间和劳动以及减少潜在的产品损失。上述步骤在pH值低于约5，优选在低于约4的pH值，更优选在约3的pH值进行。在一个实施方案中，在约pH值 3.0 ± 0.1 疏水作用层析，使用Source 15PHE疏水作用层析介质。如本文提供，纯化过程使用疏水作用层析以去除杂质，使用低pH值允许大量NAP结合于疏水基质，且使用梯度洗脱可以分离紧密相关的杂质。如本文提供，从疏水作用
15 层析介质洗脱的NAP级分经过超滤和渗滤(UF/DF)以浓缩产品并进行缓冲液交换，之后将合适的缓冲液中的NAP加样于离子交换介质以去除大部分残留蛋白和非蛋白杂质，包括紧密相结合的杂质。最后，如本文提供，从离子交换层析收集的、含高度纯化的NAP药物物质(API)的NAP级分经过UF/DF以浓缩NAP药物物质并将其交换入最终配制缓冲液。

20 在一个实施方案中，将得自用于NAP回收的Streamline SP XL层析步骤的过滤的、经调节的洗脱物在低pH(约 3.0 ± 0.1)条件加样于Source 15PHE疏水作用层介质的柱子(Amersham Biosciences)，其中大量NAP与该柱结合，然后梯度洗脱Source 15PHE，添加氢氧化钠以升高pH值至约5或更高，然后对上述洗脱的NAP级分进行UF/DF，之后将NAP溶液加样于Source 15Q离子层
25 析介质的柱子(Amersham Biosciences)，并采用梯度洗脱以从紧密结合的杂质中分离NAP药物物质。在一个实施方案中，得自离子交换层析的NAP级分含有NAP药物物质。在另一个实施方案中，如上所述进行纯化过程以获得高度纯化的rNAPc2/脯氨酸药物物质。

如本文提供，含有NAP的溶液可以经过各种过滤步骤以获得所需浓度
30 或所需剂型的NAP药物物质。可以依照要求包括额外的过滤步骤。因此，使用单独的超滤(UF)或与渗滤(DF)联用或超滤和渗滤的组合(UF/DF)，从层

析法步骤洗脱的 NAP 级分可以被过滤，浓缩，脱盐，或经过缓冲交换。如
本文提供，可以使用 UF/DF 将交换疏水作用层析洗脱缓冲液交换为离子交
换层析加样缓冲液，或将离子交换层析洗脱缓冲液交换为最终配制缓冲液
或用于 NAP 药物产品的批量药物配制品。可以用一个或多个过滤器进行 UF
5 /DF。根据一方面，使用具有所选分子量孔径大小的单个过滤器(或滤膜)进
行 UF/DF。可选择地，根据需要可以使用多个过滤器以进行扩大。在一个
实施方案中，对得自疏水作用层析步骤的 pH 调节的 NAP 级分进行超滤以
达到所需的浓度，所用滤器具有 3kDa MW 孔径大小，然后使用相同的 3kDa
MW 孔径大小滤膜，使含有 NAP 的剩余物的合并液相对 5 倍或更多倍体积
10 的离子交换加样缓冲液进行渗滤，直至确定已经达到所需的缓冲条件为止。
在一个实施方案中，对得自离子交换层析的 NAP 级分进行至少一次最终
UF/DF。在另一个实施方案中，如上所述对得自离子交换层析步骤的 NAP
级分进行 UF/DF，以将 NAP 药物物质交换入最终药物配制缓冲液。在另一
个实施方案中，使用具有 3kDa MW 孔径大小的再生纤维素超滤器进行超滤
15 或渗滤。本领域技术人员可以选择和评价适于且与实验条件及所需目标相
容的滤器或滤膜。

粗过滤

如本文提供，可以过滤并储存最终配制缓冲液中的 NAP 药物物质，或
20 进行进一步处理步骤。在一个实施方案中，对最终配制品中的 NAP 药物物
质进行填充步骤。在一个实施方案中，批量 NAP 药物物质转入合适的无菌
环境，例如生产设备中的“100级区域”(class 100 area)，并过滤入无菌容器。
在一个实施方案中，例如使用 0.2 μ m 过滤器(filter)，NAP 药物物质被过滤入
由合适的材料制成的高压灭菌的容器，例如由氟化乙丙烯(FEP)，乙烯-四氟
25 乙烯共聚物(EFTE)，或其它符合美国联邦食物药物和化妆品食品添加剂修
正案和 USP VI 级规定要求(Amendments of the U.S. Federal Food Drug and
Cosmetics and USP Class VI designation)的材料制成的容器。在一个实施方
案中，将批量 rNAPc2/脯氨酸药物产品转移入 100 级区域并使用 Millipak
0.2 μ m 过滤器过滤入高压灭菌的 1 升模制 Nalgene Tefzel® FEP 1600 系列瓶，
30 其具有模制的，无衬垫的，非污染性 Tefzel® ETFE 螺旋封口，之后将上述瓶
子转移至 -20 \pm 10 $^{\circ}$ C 的冷冻机进行储存。

可以再过滤批量 NAP 药物物质并使用与最终过滤相同的方法进行填充，例如，可以将上述较小瓶子内的填充物质转入较大的容器。在一个实施方案中，将如上所述含有 rNAPc2/脯氨酸药物物质的 Teflon FEP 瓶的内容物转移入 100 级区域中经高压灭菌的细口大玻璃瓶(carboy)，再次过滤，并且填充。

填充步骤

根据一方面，本发明进一步提供一种填充步骤，其中将最终药物配制品中的NAP药物物质填充入无菌的小瓶，容器，或其它包装。填充步骤可以包括额外的过滤步骤，并且可以包括在填充单独的小瓶，容器，或其它包装之前使用填充组件。填充步骤可以提供一小瓶NAP药物产品，其中NAP药物产品是最终的剂量形式。液体填充步骤可以提供一小瓶液态NAP药物产品。NAP药物产品可以在填充步骤期间引入的形式使用，例如，含有NAP药物产品的溶液的单位剂量。另一方面，可以在填充步骤之后进一步操作NAP药物产品的配制，例如，液体填充步骤后小瓶中的NAP药物产品可被冻干。如本文提供，可以将所需最终浓度的NAP药物物质过滤入无菌填充组件，然后填充入单独的预先灭菌的小瓶。

在一个实施方案中，rNAPc2/脯氨酸批量药物物质(浓度为 12 ± 1.2 mg/mL)用含有0.2M丙氨酸和25mM磷酸二氢钠的溶液、pH值7.0稀释至3 mg/ml。然后用 ≥ 5 倍体积的丙氨酸/磷酸盐溶液对稀释的rNAPc2/脯氨酸进行渗滤。除去rNAPc2/脯氨酸溶液，并用丙氨酸/磷酸盐溶液冲洗过滤物。然后，用过滤物冲洗液和丙氨酸/磷酸盐溶液将渗滤的rNAPc2/脯氨酸溶液稀释至2 mg/ml(如通过如下所述实施例中的UV试验测定)。然后用相同体积的25mM磷酸钠，8%蔗糖，pH值7.0稀释2 mg/ml的rNAPc2/脯氨酸溶液以达到 1.0 ± 0.1 mg/ml rNAPc2的浓度。最后，在填充步骤之前，使用Millipak 0.2 μ m过滤器(Millipore Corp.)过滤1 mg/ml配制的rNAPc2/脯氨酸溶液。通过两张同轴(in-line)的0.2 μ m Millipak过滤器将1 mg/ml的rNAPc2/脯氨酸药物产品过滤入无菌填充组件。然后将rNAPc2/脯氨酸填充入单独的预先灭菌的3 cc玻璃小瓶并部分塞紧。

作为一个选择性的实施方案，可以将rNAPc2/脯氨酸批量药物物质配制为液体药物产品。在实施例5.1中描述。

冻干

本发明提供一种可选择的冻干步骤以生产冻干 NAP 药物产品。填充步骤之后，将小瓶或其它容器中的 NAP 药物产品冷冻干燥然后密封，例如压
5 下小瓶的塞子并且给小瓶加盖。当 NAP 药物产品受到严重的温差应激时，例如 50℃、28 天，冻干剂型维持高纯度和持续的稳定性。

通过下列具体的实施例进一步说明本发明，其目的是说明生产 rNAPc2/脯氨酸的工艺的特征和由这些步骤生产的 rNAPc2/脯氨酸的特征，包括表征纯化产物的数据和方法。在下列实施例中，通过公开的生产 rNAPc2/脯氨酸
10 药物物质的方法阐明上述影响，所述 rNAPc2/脯氨酸药物物质适于作为用于药物组合物的药物产品来配制。然而，提出上述实施方案以说明本发明但不理解应为对由权利要求定义的本发明的限制。

实施例

15 实施例1.制备用于NAP药物物质表达系统的细胞库

实施例1.1 rNAPc2/脯氨酸表达系统

利用PCR拯救(rescue)，将rNAPc2基因克隆入巴氏毕赤酵母表达载体，pYAM7sp8(Laroche et al., 1994, Biotechnology 12:1119-1124)。pYAM7sp8载体
20 (图1)是pHIL-D2的衍生物(Despreaux and Manning, 1993, Gene 106:35-41)。其含有巴氏毕赤酵母AOX1基因的启动子和转录终止信号，分泌信号肽(巴氏毕赤酵母酸性磷酸酶信号序列和杂合酿酒酵母(*S.cerevisiae*) α -交配因子的pro序列的融合体)，和用于选择转染物的HIS4标记。

用于从噬菌体克隆(Jesperset al., 1995, Biotechnology 13: 3887-382)拯救 rNAPc2/脯氨酸基因的PCR引物是：

25 A8: 5'GCG TTT AAA GCA ACG ATG CAG TGT GGT G^{3'} (SEQ ID NO : 1)

A9: 5'C GCT CTA GAA GCT TCA TGG GTT TCG AGT TCC GGG ATA
TAT AAA GTC^{3'} (SEQ ID NO: 2)

上述引物分别将 *Dra*I 和 *Xba*I 位点添加至拯救的DNA片段的5'和3'末端。下划线表示与模板杂交的核苷酸。引物A9(SEQ ID NO: 2)还将一个脯氨酸密
30 码子插入至终止密码子之前，其将编码序列由编码AcaNAPc2(SEQ ID NO: 3)转化至编码AcaNAPc2/脯氨酸(SEQ ID NO: 4)。用 *Dra*I 和 *Xba*I 消化所得PCR

片段并克隆入用StuI和SpeI消化的pYAM7sp8。连接pYAM7sp8(StuI)与PCR片段(DraI)的平端导致巴氏毕赤酵母分泌信号肽与rNAPc2/脯氨酸成熟部分的框内融合。连接PCR片段的XbaI和SpeI末端与pYAM7sp8导致pYAM7sp8 SpeI位点被破坏。

- 5 通过同源重组将表达盒整合入巴氏毕赤酵母基因组来构建巴氏毕赤酵母表达菌株。用NotI消化pYAM7sp8/NAPc2构建体。消化的质粒电穿孔入巴氏毕赤酵母GS115(his4-)细胞。筛选转染体的甲醇利用表型(mut+)和rNAPc2高水平表达。筛选单独的分离株(命名为GS115/AcaNAPc2P-55)以产生原始细胞库(Master Cell Bank)(MCB)。通过使用放射性同位素标记的
- 10 rNAPc2或HIS4基因作为探针的Southern印迹来分析生产菌株。这些印迹显示多拷贝表达盒整合在AOX1基因的3'位点。

实施例1.2.原始细胞库(MCB)

- 使用单菌落分离株(GS115/AcaNAPc2P-55)的预备库(prebank)制备原始
- 15 细胞库(MCB)。含有2%葡萄糖的YEPD摇瓶(flask)培养基(细菌用蛋白胨,酵母抽提物和葡萄糖)的摇瓶中接种0.5mL预备库,并且生长至光密度(A_{550nm})0.5-1.0。收获培养物,用作为冷冻保护剂的甘油稀释至最终浓度为15%,并且冷冻于冷冻管中储存在低于-60°C。

20 实施例1.3.生产商工作细胞库(MWCB)

- 用一小瓶MCB制备新的生产商工作细胞库(MWCB)。使用MCB小瓶接种含有酵母蛋白胨培养基(蛋白胨和酵母抽提物)和2%葡萄糖的摇瓶。在28±2°C和250 rpm保温摇瓶直至光密度(A_{600nm})达到17.0±5.0。收获培养物,添加甘油直至其最终浓度为9%作为冷冻保护剂。1.1±0.1mL的等分试样填充
- 25 入2.0 mL冷冻管,在-70±10°C冷冻和储存。

实施例1.4.用于分析原始细胞库的试验方法

- 宿主鉴定.将rNAPc2/脯氨酸细胞库培养物划线至胰酶解酪蛋白大豆琼脂(TSA)平板,并保温该平板使所述培养物生长。使用Vitek®鉴定系统鉴定
- 30 分离株,所述Vitek®鉴定系统利用温度受控制的小室和光度敏感元件来监测分离悬浮液浊度的改变,所述分离悬浮液已经接种入含有针对26种常规生

物化学试验的底物的Vitek®酵母测试卡。对于rNAPc2/脯氨酸细胞库宿主鉴定, 所得反应生物模式与阳性对照生物体(巴氏毕赤酵母, ATCC No. 76273)反应生物模式比较。

5 活细胞浓度. 从3个细胞库小瓶(对于每个都从开始, 中间, 和最后)制备连续稀释物, 通过活菌落形成单位(CFU)计数测定rNAPc2/脯氨酸细胞库的活细胞浓度。稀释物一式三份铺于TSA平板, 并计数保温的CFU并进行计算以确定CFU/mL表示的细胞浓度。

10 结构基因序列分析. 制备细胞库培养物, 用于通过使用聚合酶链反应(PCR)技术扩增掺入宿主基因组的 rNAPc2/脯氨酸基因进行的基因测序。纯化 PCR 产物并确定浓度。然后使用双脱氧链终止(Sanger)方法测序 PCR 产物。所得细胞库基因序列与已知的 rNAPc2 DNA 序列比较。通过 100%匹配证实二者相同。

15 非宿主污染试验. 通过将 100mLrNAPc2/脯氨酸发酵肉汤接种到 9 个 TSA 平板中的每一个, 检测 rNAPc2/脯氨酸发酵肉汤的非宿主污染。3 个平板在 3 种温度(20-25°C, 30-34°C 和 35-39°C)保温。在 7 天的保温期内, 检查平板上不同于特征宿主的微生物菌落, 特别注意菌落形态, 颜色和/或菌落大小的差异。还对最终读取平板进行革兰氏染色。本试验包括合适的阴性对照。

20 实施例1.5. 用于分析生产商工作细胞库的检测方法

宿主鉴定. 将rNAPc2/脯氨酸细胞库培养物划线至Sabouraud葡萄糖琼脂(TSA)平板上, 并在20-25°C保温该平板7天使所述培养物生长。并行地, 以同样方式将阳性对照(ATCC *K. pastoris*菌株, 巴氏毕赤酵母的别名)划线至SDA平板上。通过革兰氏染色对所选生长的菌落进行检测。

25 保温之后, 从试样SDA平板和阳性对照SDA平板选出来自每个SDA平板的至少两个形态相似的菌落。这些菌落在分离的SDA平板上传代培养并且在20-25°C培养7天。然后对每个传代培养平板的生长物进行API 20C AUX试验和革兰氏染色。API试验系统(bioMerieux SA; Marcy l'Etoile, France)是包括20种微型生物化学试验的人工微生物鉴别试验。20C AUX试验片包括20
30 种对鉴定酵母特异的生物化学试验。比较rNAPc2/脯氨酸细胞库试样的API试验结果与阳性对照所得的结果以证实鉴定。

活细胞浓度. 从两个细胞库小瓶制备连续稀释物, 通过计数活菌落形成单位(CFU)测定rNAPc2/脯氨酸细胞库的活细胞浓度, 其中一个小瓶在冷冻细胞库之前拔出(pull)且一个小瓶在冷冻细胞库之后拔出。每份稀释物的100 μ L等分试样铺于一式双份的TSA并培养5-7天。计数所有具有可计数菌落(30-300CFU)的平板。计算得自试样稀释度相同的平板的计数的平均值, 乘以稀释度并除以100 μ L等分试样体积, 以CFU/mL记录结果。

DNA测序. 从新构建的细胞库(试验品(test article))分离总DNA。使用与克隆的NAPc2/脯氨酸基因的5'和3'序列同源的引物, 通过聚合酶链反应(PCR)扩增NAPc2/脯氨酸基因。使用标准方法纯化所得DNA片段(约500bp)并用作DNA测序的模板, 所述DNA测序使用引物步长(primer walking)策略, 该策略利用Thermo Sequenase放射标记的终止子循环测序试剂盒(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)进行。通过数字转换(digitization)阅读测序薄膜, 并且集合序列数据并使用SequencherTM软件3.0版(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI)分析。然后将受试物品产生的共有序列与NAPc2/脯氨酸基因的理论序列进行比较。

非宿主污染. 冷冻新构建的细胞库(受试品)之前, 提供一个小瓶用于非宿主检测。用盐水将肉汤样品稀释一千倍。用100 μ L稀释的试样接种九种不同培养基的一式双份的平板。此外, 以同样方式稀释阳性对照(ATCC菌株 *K. pastoris*, 巴氏毕赤酵母的别名)并接种至平板。另一组平板不接种并作为阴性对照平板。除SDA之外的所有平板在30-35 $^{\circ}$ C保温48-72小时; SDA平板在20-25 $^{\circ}$ C保温7天。1, 和2或3天后检查平板中细胞的生长。此外, 7天后检查SDA平板中细胞的生长。通过API检验和革兰氏染色鉴别任何异常菌落。

2或3天之后, 从试样TSA平板和阳性对照TSA平板选出来自每个TSA平板的至少两个形态相似的菌落。上述菌落在分离TSA平板上传代培养并且在30-35 $^{\circ}$ C保温48-72小时。然后对每个传代培养平板上的生长物进行API 20C AUX 试验和革兰氏染色。API 试验系统(bioMérieux SA; Marcy l'Etoile, France)是包括20种微型生物化学试验的人工微生物鉴别试验。20C AUX 试验片包括20种对鉴定酵母特异的生物化学试验。将受试产品的API 试验结果与获自阳性对照的结果进行比较以证实鉴定。

30

实施例2. 生产rNAPc2/脯氨酸药物物质

生产rNAPc2/脯氨酸药物物质的生产方法包括发酵，回收，纯化和粗过滤及填充。以下部分描述本方法每个阶段的单独的单元操作。图2-4显示每个单元操作的流程图，其中流程图概述设备，缓冲液，组分，和投入及产出参数。必要时可以用等同的出售商(vendor)和原料替换，同时保持与人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)活性药物组分(API)优良制造规范(GMP)(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use(ICH) Active Pharmaceutical Ingredient(API) Good Manufacturing Protocol(GMP))的要求一致。

10 实施例2.1 发酵

本节描述生产rNAPc2/脯氨酸的发酵过程。rNAPc2/脯氨酸蛋白作为巴氏毕赤酵母的分泌性蛋白质产生。rNAPc2/脯氨酸的发酵过程包括种子摇瓶，种子发酵，和生产发酵(图2，发酵流程图)。所有培养基组分使用纯净水，USP。

15 用于种子发酵的种子摇瓶。种子摇瓶单元操作的目的是为种子发酵提供合适密度的接种物。解冻3小瓶MWCB，并用1毫升无菌接种3个2升带挡板摇瓶中的每一个，所述摇瓶含有250 mL pH值 6.0 ± 0.1 的高压灭菌的培养基(表1)。摇瓶加盖并转移至 250 ± 5 rpm和 28 ± 2 °C的振荡培养箱(incubator shaker)。摇瓶保温 27.5 ± 2.0 小时，直至以细胞湿重(WCW)计的细胞密度 ≥ 30 g/L。当达到上述两个参数，2个摇瓶中的内容物无菌地转移至高压灭菌的接种瓶。

25

表 1. 种子摇瓶培养基

成分	浓度
磷酸氢二钾	2.30 g/L
磷酸二氢钾	11.8 g/L
甘油	10 mL/L
不含氨基酸的酵母氮碱	13.4 g/L

生物素	0.4 mg/L
-----	----------

种子发酵

种子发酵的目的是为生产发酵提供合适密度的接种物。将包括PTM4痕量盐(表3)的种子发酵培养基(表2)转移入种子发酵罐。蒸汽灭菌培养基，冷却，并且用过滤灭菌的28-30%氨水调节pH值至 5.0 ± 0.2 。然后通过隔膜添加消泡液至0.5 mL/L浓度，所述消泡液是过滤灭菌的5%(V/V)KFO880的50%甲醇溶液。当温度稳定在 $28.0\pm 1.0^\circ\text{C}$ 时，在培养基中接种种子摇瓶接种瓶的内容物，其比例为2.5%。用28-30%的氨水将发酵罐中的培养pH值维持在 5.0 ± 0.2 。通过测定细胞湿重(WCW)监测发酵物的生长。

- 10 发酵进行 15 ± 2 小时并且发酵至最终细胞湿重 ≥ 20 g/L。通过蒸汽灭菌的输送管路将一部分种子发酵培养物转移入高压灭菌的接种罐。检测最终种子发酵样品的非宿主污染。

表 2. 种子发酵培养基

成分	浓度
磷酸, 85 %	8.8 mL/L
硫酸钙, 二水	0.93 g/L
硫酸镁, 七水	14.3 g/L
氢氧化钾	4.2 g/L
硫酸铵	5.0 g/L
硫酸钾	18.2 g/L
甘油, 100 %	7.9 mL/L
PTM4 痕量盐(参见表 3)	3.0 ml/L

15

表 3. PTM4 痕量盐

成分	浓度
硫酸铜, 五水	2.0 g/L
碘化钠	0.08 g/L
钼酸钠, 二水	0.2 g/L

氯化锌	7.0 g/L
硫酸亚铁, 七水	22.0 g/L
硼酸	0.02 g/L
氯化钴, 六水	0.5 g/L
硫酸锰, 一水	3.0 g/L
d-生物素	0.2 g/L
硫酸	1.0 mL/L

生产发酵

产生发酵的目的是生产高水平的rNAPc2/脯氨酸蛋白质。为了实现该目的, 在诱导rNAPc2/脯氨酸基因之前, 培养物生长至高细胞密度。在产生发

5 酵罐中制备用于生产发酵的培养基(表4)。将这些培养基成份溶解并与纯化的水USP混合, 然后蒸汽灭菌。将罐冷却至其初始工作温度 $28.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 。然后添加过滤灭菌的消泡液, 所述消泡液是5%(V/V)KFO880的50%甲醇溶液。用过滤灭菌的28-30%氨水调节pH值至其初始工作范围 5.0 ± 0.3 。当达到初始工作条件时, 在培养基中接种种子发酵接种物罐的内容物, 其比例为每10kg

10 初始分批培养基接种1kg接种物(接种前(preinoculate)重量)。

表4. 生产发酵培养基

成份	浓度
磷酸, 85%	8.8 mL/L
硫酸钙, 二水	0.93 g/L
硫酸镁, 七水	14.3 g/L
氢氧化钾	4.13 g/L
硫酸钾	18.2 g/L
硫酸铵	5.0 g/L
甘油, 100%	23.8 mL/L
PTM4盐(参见表3)	3.2 mL/L

生产发酵由4个不同的阶段组成: 甘油分批, 甘油补料分批, 甲醇适应和甲醇诱导。贯穿发酵过程中, 通过以恒定速率添加空气并利用吸入压力

(backpressure)和可变搅拌(viable agitation)维持溶氧水平在约35%。如果一旦达到最大搅拌时还需要额外的氧,用氧气补充空气气流。用28-30%氨水维持发酵罐中培养物的pH值。定期添加消泡液以控制泡沫。

上述发酵的第一个阶段甘油分批阶段,构建生物量。发酵罐在 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 工作,直至通过由甘油代谢停止所引起的氧峰检测到培养基中的甘油耗尽为止。

该过程继之以甘油补料分批阶段,其中以 $18.0\pm 1.0\text{ mL/kg}$ 接种前重量/小时给培养物供应50% w/w甘油溶液总共8.5小时,以增加生物量并抑制表达。在甘油补料阶段的第一个4.5小时期间,以每小时0.5pH值单位的速度将上述培养物的pH值设定点(set point)从 5.0 ± 0.3 降低至 2.9 ± 0.1 ,并在发酵的其余阶段维持该pH值,也就是在甲醇诱导的基因诱导截短期间。该阶段中温度始终维持在 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。甘油补料分批阶段结束前, $\text{WCW} \geq 225\text{ g/L}$ 。

在甲醇适应阶段期间,终止甘油补料并替换为诱导生物体产生rNAPc2的甲醇补料。甲醇补料(含有6.0 mL/L KFO880消泡剂)起始于3.0 mL/Kg接种前量/小时。启动添加甲醇2小时之后,开始检测培养物的甲醇适应。甲醇适应检测简要地包括终止补料并证实溶氧峰。添加甲醇的第一个4小时之后,在2小时期间内将温度降低至 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。添加甲醇的第一个4小时之后和证实培养物利用甲醇之后,以1.0 mL/Kg接种前量/小时增加甲醇补料速度。每小时测量甲醇消耗量以保证甲醇完全耗尽,甲醇完全耗尽时,以1.0 mL/Kg接种前量/小时增加甲醇补料速度,直至达到6.0 mL/Kg接种前量/小时的最终补料速率。

在甲醇诱导阶段期间,在整个剩余发酵过程中维持甲醇适应阶段末期的操作条件。自总发酵时间的约48小时开始,通过C8反相测定法测定肉汤上清液的浓度来监控rNAPc2/脯氨酸的产生。在生产发酵罐中保持144至168小时之后及通过C8反相测定法测定的rNAPc2/脯氨酸浓度 $\geq 0.55\text{ g/L}$ 之后,收获生产发酵罐。检测最终发酵样品的非宿主污染。

在甲醇适应阶段和甲醇诱导阶段期间,维持在pH值 2.9 ± 0.1 。发酵肉汤的pH值为 2.9 ± 0.1 。

30 实施例 2.2 回收

本节描述rNAPc2/脯氨酸产品的回收过程。rNAPc2/脯氨酸的回收过程包括膨胀床层析单元操作，如图3的流程图所示。

Streamline SP XL 离子交换层析

5 *Streamline SP XL* 离子交换层析步骤的目的是从细胞碎片分离rNAPc2/脯氨酸，并将产物交换入适合第一步纯化层析步骤的缓冲液。用来达到分离目的的介质是*Streamline SP XL*树脂(Amersham Biosciences)的膨胀床离子交换色谱柱。

用纯净水稀释发酵肉汤(pH值 2.9 ± 0.1)至电导率 ≤ 9 mS/cm。使用17.4M
10 乙酸调节溶液浓度为150mM乙酸盐且pH值为 3.1 ± 0.2 。上样溶液加载于用pH3.2的500mM乙酸钠，再用pH3.2的50mM乙酸钠平衡的膨胀的树脂柱床。先用pH3.2的50mM乙酸钠，再用pH3.2的50mM乙酸钠/150mM NaCl以向上流动(upflow)的方式洗柱。允许树脂床沉降并用pH值3.2的50mM乙酸钠/150mM NaCl以向下流动(downflow)的方式进行额外洗涤。使用pH值3.2的
15 50mM乙酸钠/350mM NaCl洗脱rNAPc2/脯氨酸，并通过上述C8反相测定法测定rNAPc2/脯氨酸浓度。

准备Source 15PHE纯化层析步骤时，向*Streamline*洗脱物添加固体硫酸钠至终浓度为0.85M。用2.4M柠檬酸调节pH值至 3.1 ± 0.2 ，并证实电导率是 100 ± 10 mS/cm。调节过的*Streamline*洗脱物通过 $0.45 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。

20

实施例 2.3. 纯化

本节描述rNAPc2/脯氨酸生产的纯化过程。rNAPc2/脯氨酸的纯化生产过程包括：疏水作用层析步骤，超滤和渗滤步骤，离子交换层析步骤，继之以超滤/渗滤步骤，和最终过滤及rNAPc2/脯氨酸药物物质(也称为活性药
25 物成分(API))的填充，如图4所示。

Source 15PHE 疏水作用层析

初始纯化步骤通过使用Source 15PHE疏水作用层析介质的柱子(Amersham Biosciences)去除rNAPc2/脯氨酸中的一些蛋白质和非蛋白质杂
30 质，对产物进行部分纯化。

将经过滤的，经调节的Streamline洗脱物上样于预先用pH值3.0的50mM柠檬酸钠/1.1M硫酸钠平衡的Source 15PHE柱。上样后，用平衡缓冲液洗柱。使用15倍柱体积、pH值3.0的1.1M至0.3M硫酸钠的50mM柠檬酸钠溶液梯度，洗脱rNAPc2/脯氨酸蛋白质，继之以0.3M硫酸钠梯度洗脱直至UV吸光率回到基线。收集跨rNAPc2/脯氨酸洗脱峰的级分，然后通过C18反相测定法分析。合并含有高纯度的rNAPc2/脯氨酸的级分，并通过UV测定法对得到的浓度进行检测。通过添加5N NaOH调节Source 15PHE合并液的pH值至5.3±0.1。

10 超滤/渗滤步骤 #1(UF/DF #1)

UF/DF #1的目的是浓缩产物，并将rNAPc2/脯氨酸交换入用于Source 15Q层析的缓冲液。使用3kD分子量孔径的再生纤维素超过滤器(filter)。

使用预先用pH值5.3的50 mM乙酸钠平衡的UF/DF #1膜将pH值调节的Source 15PHE合并液浓缩至2.0±0.5 g/L(通过UV测定浓度进行检测)。然后用pH值5.3的≥5倍体积的50mM乙酸钠渗滤合并液，直至pH值为5.3±0.1且电导率<6.0 mS/cm。渗滤的UF/DF #1合并液通过0.2µm滤膜过滤，为上样于Source 15Q柱作准备。

Source 15Q离子交换层析

20 最终的层析单元操作通过使用Source 15Q离子交换层析介质的柱子(Amersham Biosciences)自 rNAPc2/脯氨酸去除大部分残余的蛋白质和非蛋白质污染物。

上述过滤的UF/DF #1合并液上样于用pH值5.3的500 mM乙酸钠，继之以pH值5.3的50mM乙酸钠预先平衡的Source 15Q层析柱。上样后，用平衡缓冲液(pH值5.3的50mM乙酸钠)洗柱。将20倍柱体积的0至400mM的 NaCl线性梯度(50mM乙酸钠溶液中，pH值5.3)加样于柱。跨洗脱峰收集级分，然后通过C18反相测定法分析。合并含有高纯度rNAPc2/脯氨酸的级分，并通过UV测定浓度进行检测。

30 最终超滤/渗滤步骤(最终UF/DF)

最终UF/DF的目的是浓缩产物，并将rNAPc2/脯氨酸交换入最终配制缓冲液。使用3kD分子量孔径的再生纤维素超过滤器。

使用预先用最终配制缓冲液(pH值7.0的65mM磷酸钠/80mM氯化钠)平衡的最终UF/DF膜浓缩Source 15Q合并液至 12.0 ± 0.5 g/L(通过UV试验得到的浓度进行检测)。然后用 ≥ 6 倍体积的配制缓冲液渗滤合并液，直至pH值为 7.0 ± 0.1 。

实施例 2.4. 粗过滤和填充

纯化的rNAPc2/脯氨酸API转移入100级区域，并用Millipak 0.2 μ m过滤器过滤至高压灭菌的1升模制的Nalgene Tefzel® FEP(氟化乙丙烯)1600系列瓶中，所述瓶具有模制的，无衬垫的，非污染性Tefzel® ETFE(乙烯-四氟乙烯共聚物)螺旋封口。将上述瓶转移入 $-20 \pm 10^\circ\text{C}$ 冷冻机进行储存。

可以使用与最终过滤相同的方法再次过滤批量API并进行填充。Teflon FEP瓶中的内容物转移入100级区域中经高压灭菌的细口大玻璃瓶，再次过滤，并且填充。考虑贮藏容器和密封：FEP和ETFE均满足美国联邦食品药物和化妆品法案的食品添加剂修正案的要求(Food Additives Amendment of the U. S. Federal Food Drug and Cosmetics Act)。上述材料满足美国药典VI级(USP Class VI)的要求。

20 实施例3. 在线控制；rNAPc2/脯氨酸在线(in-process)检测方法

工艺流程图(图2-4)列出了监测的包括在线验收标准在内的条件。下面简要描述在线检测方法。

rNAPc2 在线检测方法

25 *pH.* 检测之前即刻，用由NIST可示踪pH标准品校准的pH计读取样品。样品的pH值在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 读取。

电导率. 使用电导率计测量溶液的电解成份，该电导率计已经通过包括所测范围的电导率标准品来标准化。样品的电导率在 $\sim 25^\circ\text{C}$ 读取。

30 *细胞湿重.* 将约1.5mL发酵样品加入配衡的微量离心管，以10,000rpm离心约5分钟。倾倒入每管的上清液，并称含有固体的管。细胞湿重等于净重除以原始样品体积。

非宿主污染试验. 通过向9个TSA平板的每一个上接种100 μ l种子和生产发酵样品的最终肉汤, 检测所述肉汤的非宿主污染。在3种温度培养3个平板(20-25 $^{\circ}$ C, 30-34 $^{\circ}$ C和35-39 $^{\circ}$ C)。在保温平板的7天期间, 检查平板上不同于特征宿主的微生物菌落, 特别注意菌落形态, 颜色和/或菌落大小的差异。

5 在最终读取日还进行革兰氏染色。试验包括合适的阴性对照。

C8 反相测定法(浓度和纯度). 生产发酵样品的上清液和 Streamline SP XL 样品通过 0.22 μ m 过滤器过滤, 然后注射到 Kromasil C8, 4.6 \times 250mm 反相柱上。在样品注射之前, 用 22%乙腈, 0.1%三氟乙酸(TFA)平衡柱子。然后用 22-28%乙腈的 0.1%TFA 溶液, 以 1 mL/min 进行线性梯度洗脱超过二十分钟, 洗脱 rNAPc2/脯氨酸物质。使用具有已知浓度的 rNAPc2/脯氨酸的标准稀释物, 生成基于 rNAPc2/脯氨酸 mg/mL 相对于峰面积的线性回归的标准曲线。从上述标准曲线外推任何样品中的 rNAPc2/脯氨酸量, 并除以注射的样品体积, 以确定样品中 rNAPc2/脯氨酸的浓度。rNAPc2/脯氨酸的纯度以总峰面积的百分数计算。

10

15 通过UV测得的浓度. 得自Source 15PHE到最终UF/DF步骤的每份纯化合并液的浓度用适当校准的分光光度计所示其在280nm的吸光率来确定。在测定试样之前, 使用合适的缓冲溶液将仪器调零。在线性范围内(0.13-1.62AU)通过稀释制备试样。280nm的吸光率的平均值除以消光系数[0.59AU/cm⁻¹(mg/mL)⁻¹]并乘以稀释因子得到以mg/mL表示的浓度。

20 C18 反相测定法(纯度). 通过C18反相测定法分析Source 15PHE级分和合并液, UF/DF # 1 合并液, Source 15Q级分和合并液, 和最终UF/DF合并液的纯度。通过线性梯度反相层析分离样品的其它组分与rNAPc2/脯氨酸。如果必要的话, 将样品稀释为约1 mg/mL的cPBS溶液, 并将30 μ l注入Waters Symmetry C18 反相柱(5 μ m 颗粒, 4.6mm I.D.x250mm 长, Waters Corp.,

25 Bedford MA), 该柱用 78%流动相 A(0.1%TFA 水溶液)和 22%流动相 B(0.1% TFA 乙腈溶液)平衡。然后在二十分钟时间后, 流动相 B(流速 1mL/min)的百分比线性增加至 26%。通过UV检测器在210 nm监测峰。通过将层析图中 rNAPc2/脯氨酸峰面积除以总峰面积计算 rNAPc2/脯氨酸的纯度, 并以百分比表示。

30

实施例4. rNAPc2/脯氨酸API检测方法

外观, pH值, 和浓度: 目测等分受试品的颜色, 透明度和任何可见杂质的存在。在检测之前, 使用通过NIST可示踪pH标准品校准的pH计读取样品。在 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 读取样品的pH值。通过合适校准的分光光度计测定的样品在280nm处的吸光率确定样品浓度。测定检测样品之前, 用样品稀释剂将仪器
5 调零。在方法证实期间, 通过在确定的线性范围(0.13-1.62AU)内稀释制备一式三份的检测样品。280nm处吸光率的平均值除以 $0.59\text{AU}/\text{cm}^{-1}(\text{mg}/\text{mL})^{-1}$ (消光系数)并乘以稀释因子得到以mg/mL表示的浓度。

肽图: 在酶消化之前, 还原并烷基化 rNAPc2/脯氨酸受试品和 rNAPc2/脯氨酸参照标准品。用高浓度盐酸胍处理使 rNAPc2/脯氨酸变性, 然后用二
10 硫苏糖醇还原。然后用碘乙酰胺烷基化还原的胱氨酸。在 $37\pm 2^\circ\text{C}$, 用 2% w/w 胰蛋白酶消化还原并烷基化的 rNAPc2/脯氨酸制品约 16 小时。然后通过反相层析分离得自每份消化的 rNAPc2/脯氨酸蛋白质样品的胰蛋白酶消化所得的肽(tryptic peptide), 以产生层析图或“指纹”形式的片段模式。利用峰的保留时间, 目测比较样品洗脱图谱和标准洗脱图谱。所述图谱必须是可
15 比较的, 没有新的或缺失的峰。

SDS-PAGE 考马斯(相同性/纯度):

存在或不存在还原剂的情况下, 使用Novex NuPAGE® LDS样品制备缓冲液(pH值8.4)稀释受试品、rNAPc2/脯氨酸参照标准品和rNAPc2/脯氨酸强度
20 标记分别至0.5, 0.5和0.005 mg/mL的最终浓度。根据生产商说明稀释蛋白质标准品的混合物(Novex Mark 12®)。还原的样品在 $95\pm 2^\circ\text{C}$ 加热5分钟。还原的和未还原的样品跑分离胶。通过在Novex NuPAGE®预制的(pre-cast)4-12%丙烯酰胺Bis-Tris凝胶在pH值6.4进行电泳, 分析各自10 μg 样品载量的参照标准品和试样, 0.1 μg 样品载量的强度标记(1%样品载荷), 和
25 合适重量的Mark 12标准品。用Novex胶体考马斯蓝染色剂染色凝胶。为了证实相同性, 目测比较主要条带与参照标准品和蛋白质标准品的混合物。目测比较任何杂质条带的强度与1%强度标记条带。报告任何强于标记的杂质条带。如果不存在强于标记的杂质条带, 则纯度报告为与参照物可比。注意rNAPc2/脯氨酸条带不以预期的分子量出现。因为其是非球形的,
30 rNAPc2/脯氨酸以较大的表观分子量展开。非还原凝胶上, rNAPc2/脯氨酸

条带在21.5和31kDa标准品之间跑胶,在还原凝胶上,rNAPc2/脯氨酸条带跑得与21.5kDa标准品(Novex产品,来自Invitrogen Corp., Carlsbad CA)一致。

5 *C18反相*: 通过线性梯度反相HPLC从样品的其它成份分离rNAPc2/脯氨酸。rNAPc2/脯氨酸的纯度以层析图中rNAPc2/脯氨酸峰面积除以总峰面积的比例报告,以百分比表示。30 μ l 约1 mg/mL的样品稀释物cPBS溶液被注入Waters Symmetry C18反相柱(5 μ m颗粒,4.6mm I.D.x250mm长度, Bedford MA),该柱在78%流动相A(0.1%的TFA水溶液)和22%流动相B(0.1%的TFA乙腈溶液)中平衡。然后利用流速1 mL/min,在20分钟期间后流动相B的百分比线性增加至26%。通过UV检测器在210nm监测峰。

10 *内毒素*: 通过美国药典方法测定内毒素。

生物活性: rNAPc2/脯氨酸以浓度依赖性方式延长通过添加促凝血酶原激酶(thromboplastin)来启动的人血浆凝固的时间。在自动凝血酶原时间(PT)凝结试验中,使用兔脑促凝血酶原激酶(组织因子, Simplastin-Excel)启动凝结,来直接测定rNAPc2/脯氨酸对人血浆凝结的抗凝血效果。rNAPc2/脯氨酸参照标准品和rNAPc2/脯氨酸样品在试验缓冲液中稀释至1035nM。然后检测仪器(Coag-A-Mate®MAX, Organon Teknika, 目前由bioMérieux, Durham NC拥有)从初始制品制备一组人血浆中的稀释物,并以秒测定凝固时间(CTs)。由rNAPc2/脯氨酸的log CTs相对于稀释浓度的线性回归拟合确定曲线。然后用受试品曲线的斜率与参照标准品曲线的斜率之比乘以参照标准品的活性,计算受试品的生物活性。

20 *生物负荷*: 将2份10mL等分试样通过分离的0.45 μ m纤维素酯滤膜过滤,测定样品的总需氧计数(TAC)和总酵母/霉菌计数(TYMC)。准备滤膜,且一个在TSA琼脂平板上、30-35 $^{\circ}$ C保温48-72小时,另一个在SDA琼脂平板上、20-25 $^{\circ}$ C保温5-7天。保温期之后,计数两种琼脂平板类型上的菌落形成单位(CFU)。报告每10mL样品的相加的CFU数。

25 *残余DNA*: 阈值总DNA测定法(Threshold Total DNA Assay)(Molecular Devices Corp. Sunnyvale CA)对单链DNA是特异的。它具有3个阶段。在反应阶段,单链DNA与标记试剂中的2种结合蛋白反应。一种结合蛋白是来自大肠杆菌的高亲和力单链DNA结合蛋白(SSB),其与生物素偶联。还存在链霉抗生物素,其与SSB偶联物上的生物素紧密结合。另一结合蛋白是针对单链

DNA的单克隆抗DNA抗体，其与尿素酶结合。在37℃，上述结合蛋白质与DNA在溶液中形成复合体。

分离阶段发生于阈值工作站(Threshold Workstation)。上述DNA复合体通过生物素包被的硝化纤维膜进行过滤。膜上的生物素与DNA复合体中的链霉抗生物素反应，捕捉所述复合体。快速洗涤步骤从膜上去除非特异性酶。对于检测阶段，检测棒(stick)(含有生物素涂覆的硝化纤维膜)置于含有底物尿素的阈值读数计中。酶促反应改变底物溶液的局部pH值。硅传感器记录与pH值改变成比例的表面电位的改变。阈值工作站，计算机和阈值软件监测每个测定点的表面电位改变。使用预先产生的标准曲线，计算机分析这些动态测量并量化结果。阈值软件计算以皮克DNA计的每份样品的浓度。

分子排阻:根据分子大小的差异，通过大小排阻层析法从样品的其它成份分离rNAPc2/脯氨酸。通过比较5个系统适合性标准品与3份样品重复的平均保留时间(RT)，证实rNAPc2/脯氨酸的相同性。RT必须是97.0至103.0%。rNAPc2/脯氨酸的纯度以层析图中的rNAPc2/脯氨酸峰面积除以总峰面积来计算，并以百分比表示。在cPBS中制备样品稀释物，至约1mg/ml的标称(nominal)浓度，并注射到大小排阻柱(Superdex 75 10/30, Amersham Biosciences)上。流速维持在0.5 mL/min。通过210nm处的UV检测监测出峰。

质谱测定的分子量:使用VG Bio-Q(Quattro II Upgrade)四极质谱仪(Micromass, Danvers, MA制造，目前由Water Corp., Bedford, MA拥有)，通过电喷射质谱测定分子量。用0.1%三氟乙酸水溶液将样品稀释至约1 mg/ml，并注射到预先洗涤的Trap筒(Cartridge)上以对其进行脱盐。然后洗脱所述筒经由进样口至分光计上。

N-末端测序:使用Procise N-末端测序系统(Applied Biosystems, Foster, City CA)，测序自受试品N-末端的15个残基。在检测样品之前和之后，测序β-乳球蛋白校准标准品的15个残基。上述Procise系统未观察到Cys(半胱氨酸)残基。比较所得序列和受试品的理论序列。

实施例5.生产rNAPc2/脯氨酸药物产品

实施例5.1.生产液体药物产品

图5的药物产品流程图给出了rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的生产过程。从-20℃保存物中取出保存的冷冻rNAPc2/脯氨酸API，并在2-8℃解冻。

一旦解冻，API转入混合区域以合并和混合。为了产生药物产品，用pH值7.0的65mM磷酸钠/80mM NaCl稀释API至 1.0 ± 0.1 mg/mL的最终浓度，上述浓度通过UV浓度测定来测定(如上所述)。使用在线浓度测量逐步进行稀释，以保证达到指定浓度。然后通过0.2 μ m微孔Millipak过滤器过滤稀释的API，并置于2-8 $^{\circ}$ C短期储存。

对于填充步骤，经由2个同轴的0.2 μ m微孔Millipak过滤器将稀释的API过滤入无菌填充组件(suite)。进行取样用于批量无菌试验(Bulky Sterility testing)。然后将稀释的API填充入2cc预灭菌的小瓶，立即塞住并加盖。小瓶中的靶体积是0.6mL。

10 储存之前，利用设计成能照明小瓶和产品的光线和背景，在受控制的条件下，对小瓶进行100%目测检查，使有缺陷的小瓶，或含有明显微粒的小瓶可容易地被检出并从批次(lot)中去除。然后将小瓶置于标记的储存托盘中，并在2-8 $^{\circ}$ C短期储存，在-20 \pm 10 $^{\circ}$ C长期储存。表5列举了每小瓶的rNAPc2/脯氨酸液体药物产品的组成。

15 表 5. rNAPc2/脯氨酸液体药物产品成分

物质名称	等级	每瓶的量
rNAPc2/脯氨酸	N/A	0.6 ± 0.06 mg
磷酸氢二钠，七水	USP	6.4 mg
磷酸二氢钠，一水	USP	2.1 mg
氯化钠	USP	2.8 mg
注射用水	USP	q.s. 至 0.6 mL
磷酸	NF	按需调节 pH 值至 7.0 ± 0.1
1N 氢氧化钠的 WFI 溶液	由 NF 级片剂制备	按需调节 pH 值至 7.0 ± 0.1

实施例5.2.冻干的药物产品的生产

20 用0.2M丙氨酸和25mM磷酸二氢钠、pH值7.0，将rNAPc2/脯氨酸批量药物物质溶液(浓度 12 ± 1.2 mg/mL，在65mM磷酸钠/80mM氯化钠溶液、pH值 7.0 ± 0.1 中)稀释至3 mg/mL。然后，将稀释的rNAPc2/脯氨酸与丙氨酸/磷酸盐溶液进行缓冲液交换。然后使用丙氨酸/磷酸盐溶液稀释上述rNAPc2/脯氨酸溶液至2mg/mL(通过UV浓度测定法测定浓度)。然后用等体积的25mM磷

酸钠，4%蔗糖，pH值7.0稀释2 mg/mL rNAPc2/脯氨酸溶液以达到 1.0 ± 0.1 mg/mL rNAPc2的浓度。最后，使用0.2 μ m过滤器过滤1mg/mL配制的rNAPc2/脯氨酸溶液。

对于填充，经由0.2 μ m过滤器过滤1mg/mL的rNAPc2/脯氨酸溶液。然后将rNAPc2/脯氨酸填充入单独预灭菌的3cc玻璃小瓶并部分塞好。然后在冷冻干燥器中冻干所述小瓶。冻干之后，按下塞子并给小瓶加盖。当NAP药物产品受到严重的温度应激，例如28天、50 $^{\circ}$ C，上述冻干剂型维持高纯度和持续的稳定性。表6列举每只小瓶中rNAPc2/脯氨酸冻干药物产品的成分。

10 表 6. rNAPc2/脯氨酸冻干药物产品成分

物质名称	等级	每瓶含量
rNAPc2/脯氨酸	N/A	0.83 mg
丙氨酸	USP	7.5 mg
磷酸二氢钠，一水	USP	2.9 mg
蔗糖	USP	3.3 mg
注射用水	USP	q.s. 至 0.83 mL
1N 氢氧化钠的 WFI 溶液	由 NF 级片剂制备	按需调节 pH 值至 7.0 ± 0.1

实施例6. 推算NAP蛋白质等电点

测定各种NAP的等电点(pI)，以证实本文公开的方法适于生产其它NAP药物物质和NAP药物物质。通过pI预测程序计算5,866,542公开的NAP蛋白质的序列。表7显示了通过ProtParam 和Atalier BioInformatique计算的US公开的NAP蛋白质的pI。ProtParam利用瑞士生物信息学学会(the Swiss Institute of Bioinformatics SIB)开发的ExpASy(专家蛋白质分析系统 Expert Protein Analysis System)，其可以在<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>找到，主机为美国北卡罗来纳州超级计算中心(North Carolina Supercomputing Center) (NCSS)。可以在http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html找到 Atalier BioInformatique(aBi)，主机为Université Aix-Marseille I。

20 表 7. 预测的 NAP 蛋白质的 pI

序列名称	通过 ProtParam 计算的 pI	通 过 BioInformatique 计算的 pI
AcaNAP5	4.32	4.10
AcaNAP6	4.25	4.03
AcaNAPc2	4.31	4.10
AcaNAPc2/脯氨酸	4.31	4.10
AcaNAP23	4.54	4.30
AcaNAP24	4.72	4.45
AcaNAP25	4.72	4.48
AcaNAP31, 42, 46	4.28	4.07
AcaNAP44	4.74	4.48
AcaNAP48	4.34	4.13
AceNAP5	4.49	4.25
AceNAP7	4.62	4.37
AduNAP4	4.55	4.33
HpoNAP5	7.62	7.50

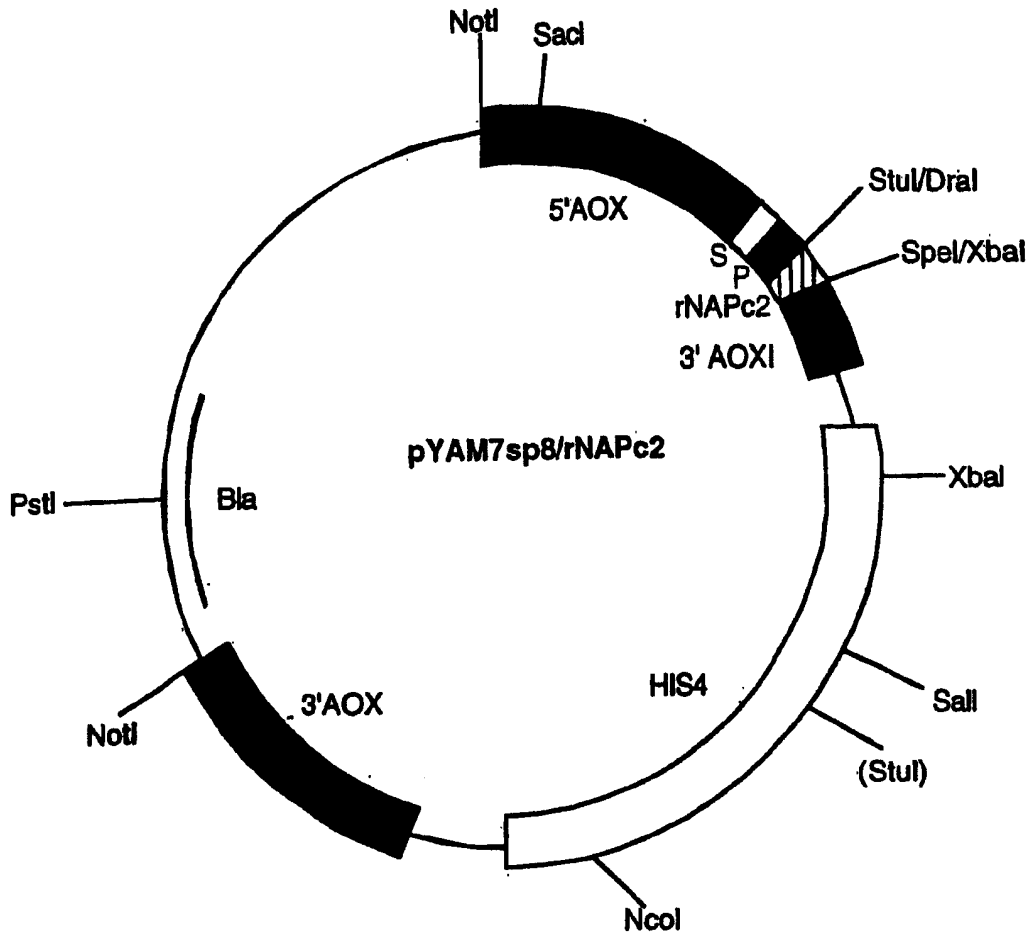


图 1

发酵流程图

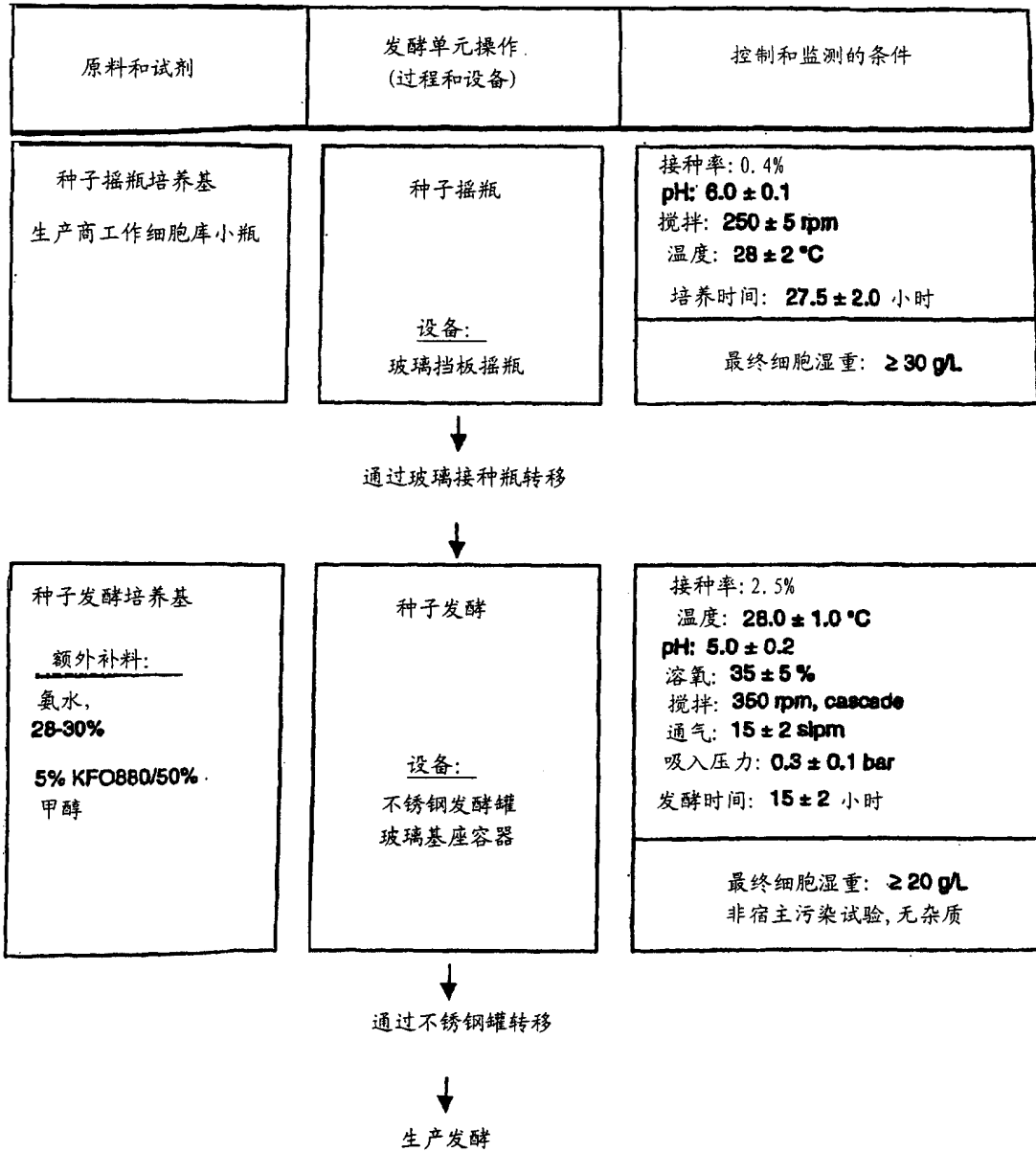


图 2A

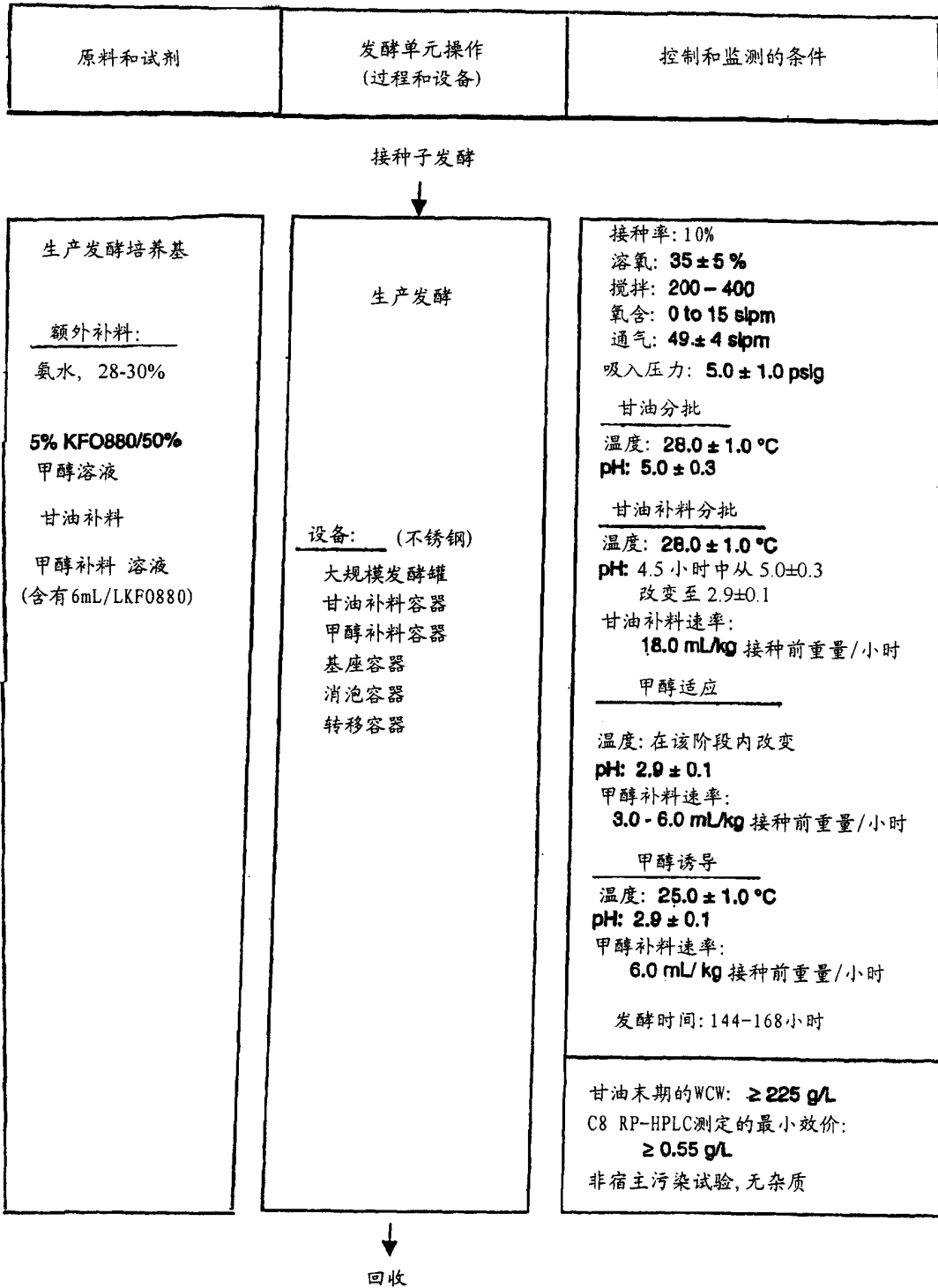


图 2B

回收流程图

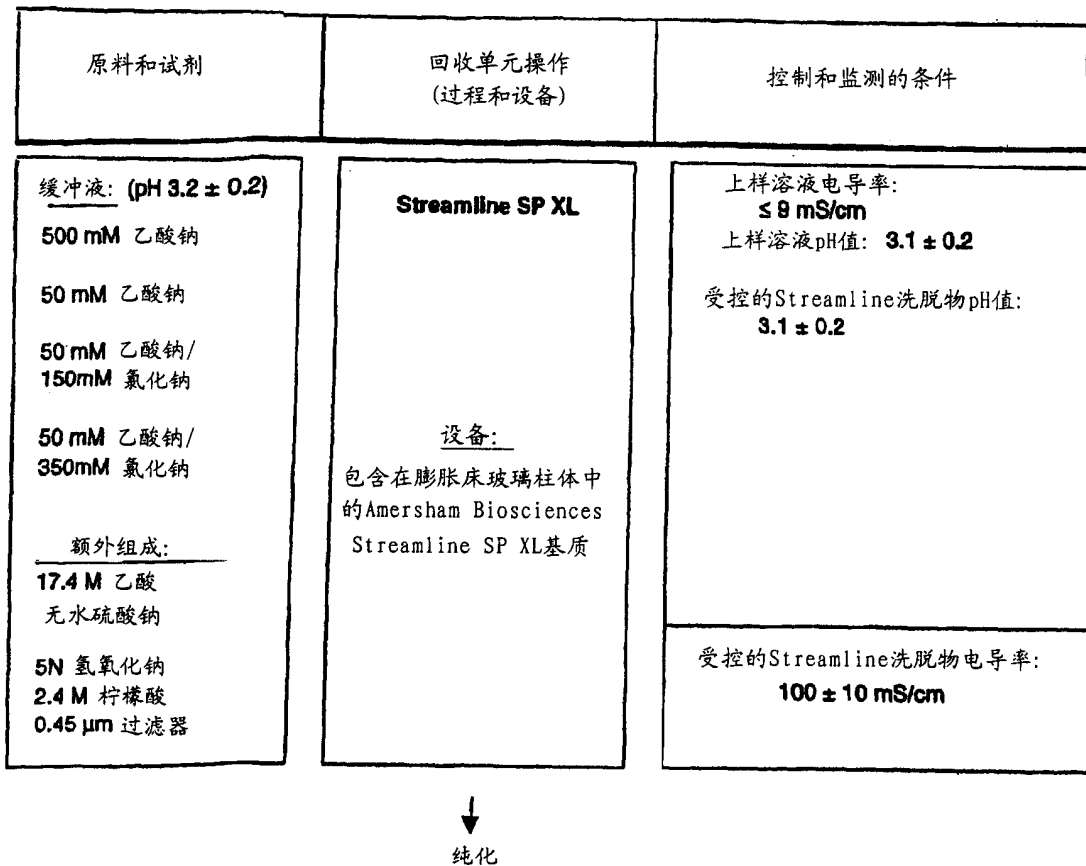


图 3

纯化流程图

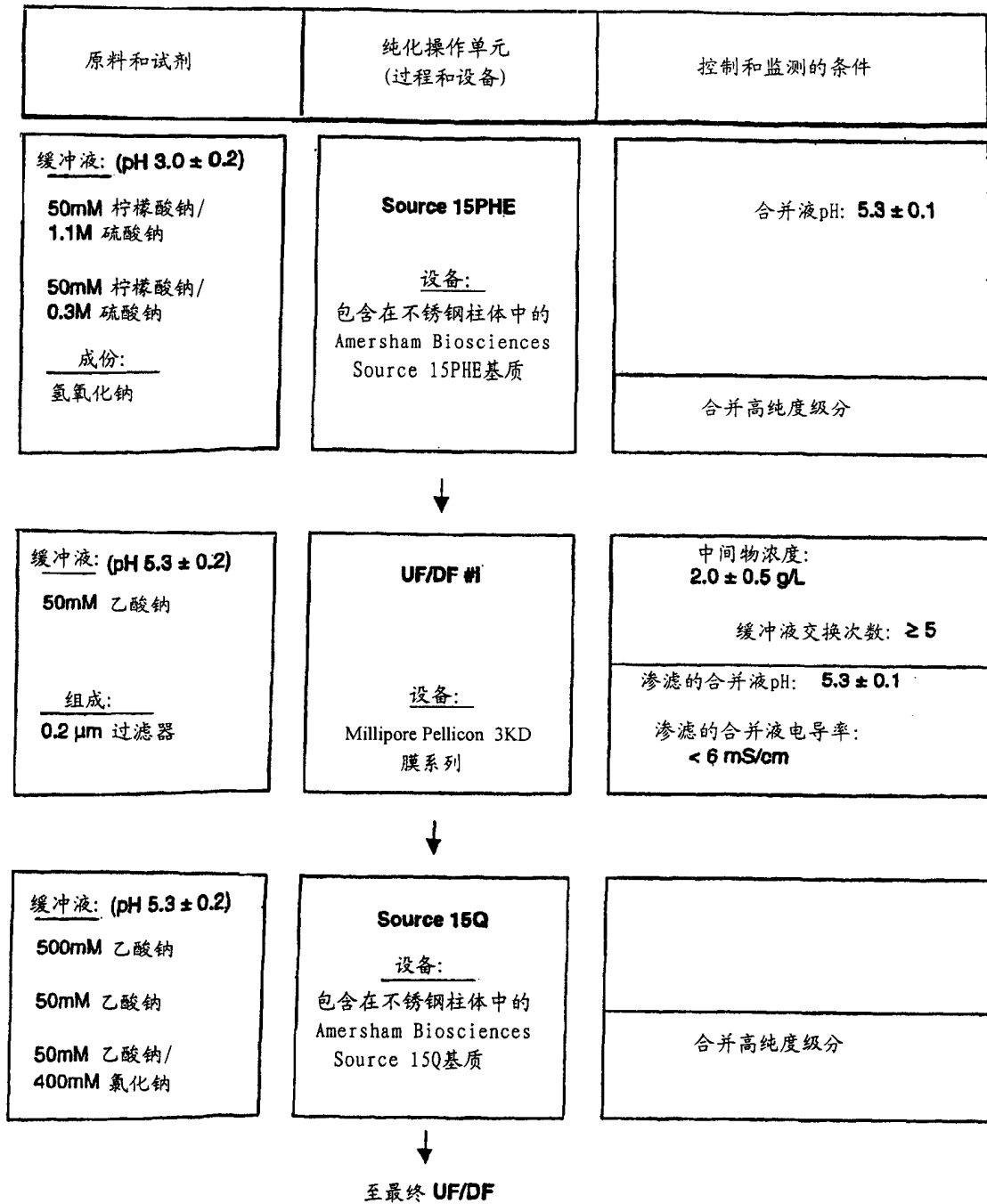


图 4A

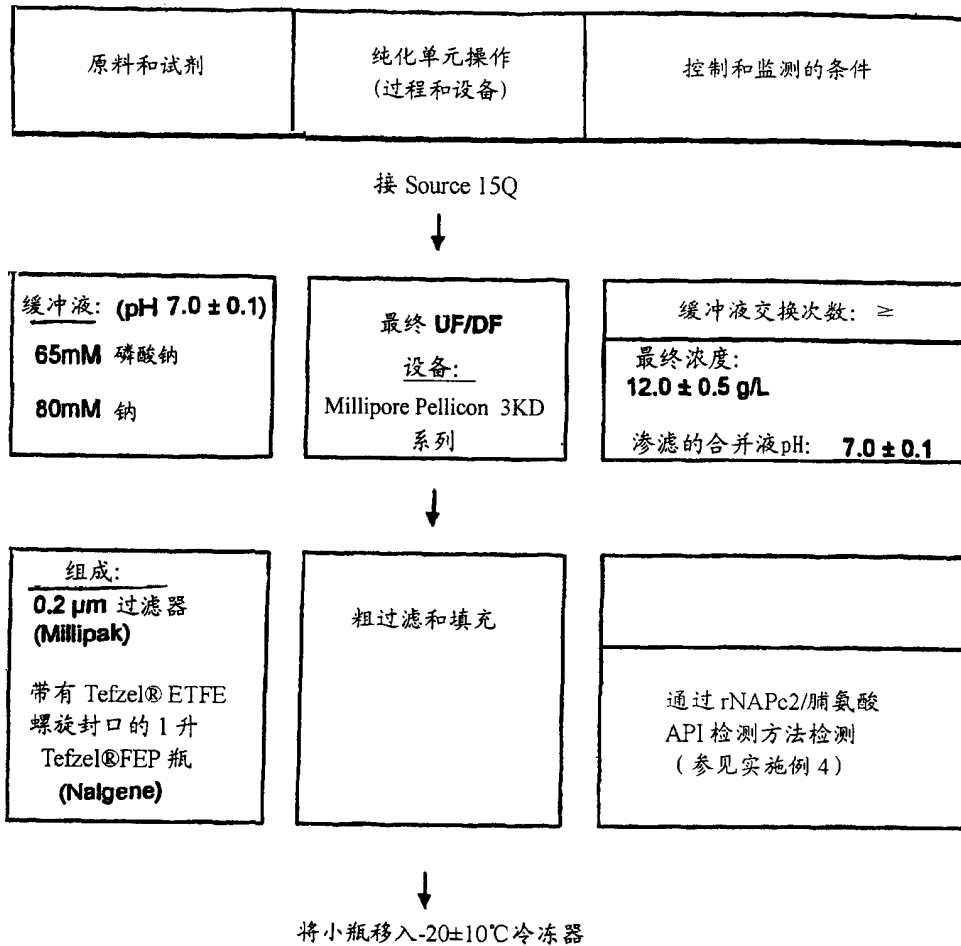


图 4B

液体药物产品流程图

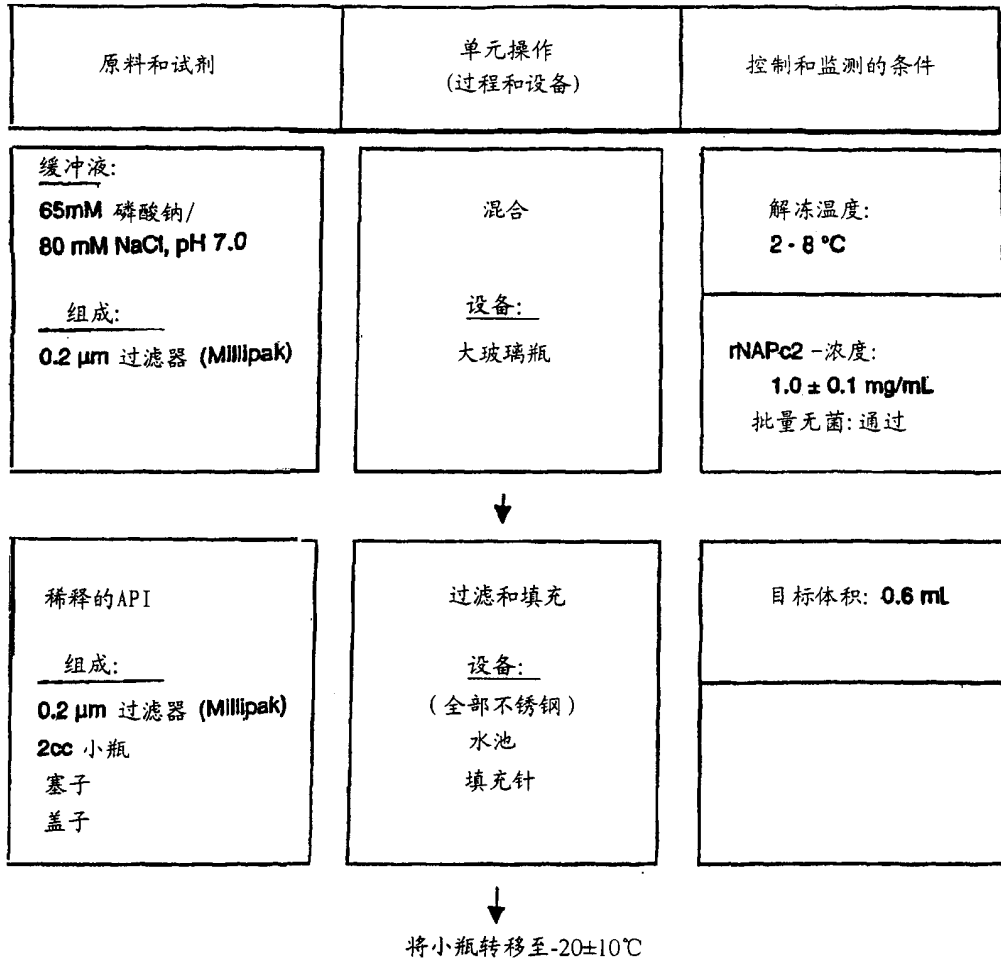


图 5

冻干药物制剂配制

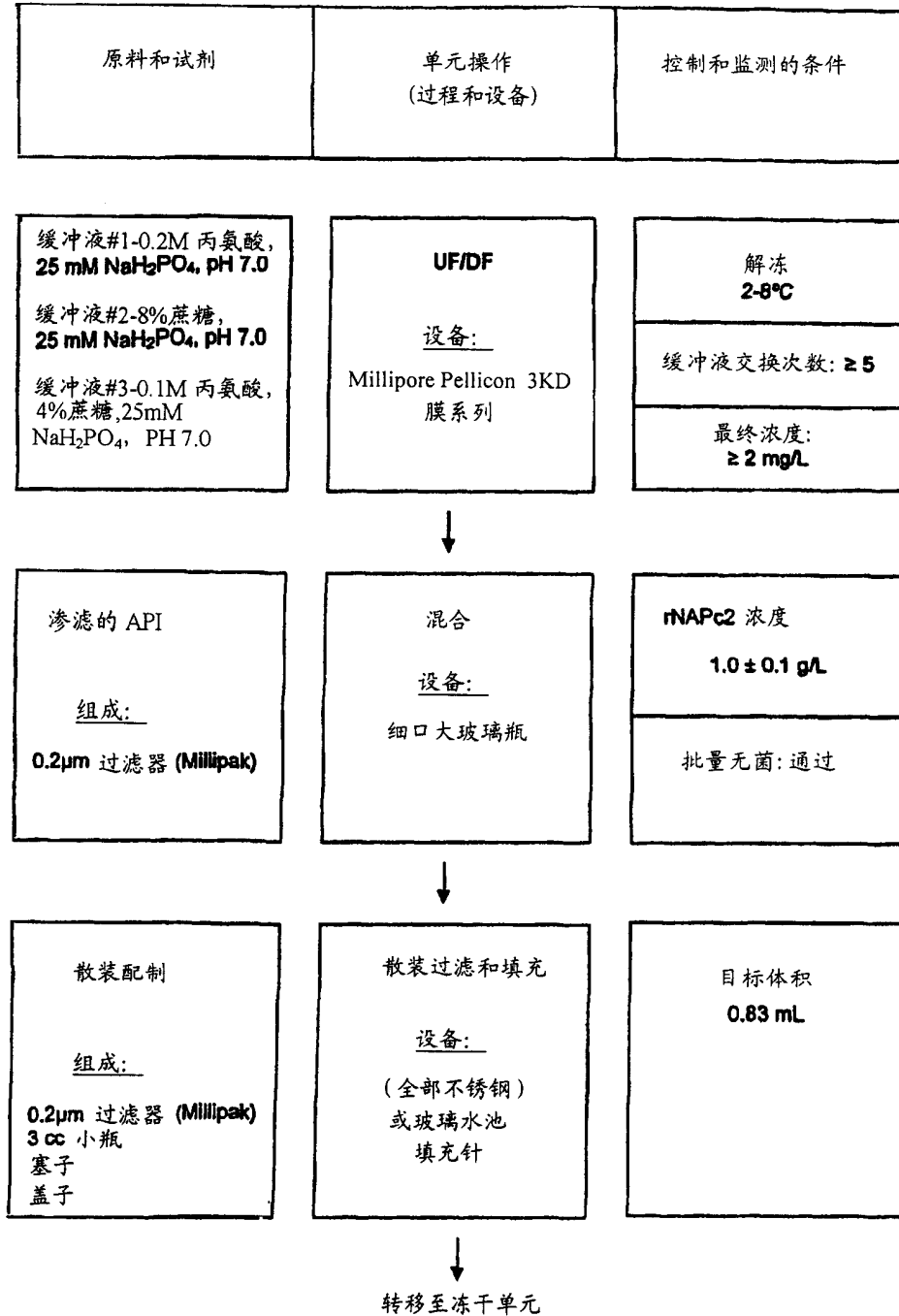


图 6