



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I531576 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：102125684

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 18 日

(51)Int. Cl. : C07K1/22 (2006.01)

C07K14/745 (2006.01)

B01D15/38 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/19

歐洲專利局

12305882.8

(71)申請人：法國分裂與生物技術實驗室 (法國) LABORATOIRE FRANCAIS DU

FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES (FR)

法國

(72)發明人：巴塔耶 達米恩 BATAILLE, DAMIEN (FR)；諾格里 米歇爾 NOGRE, MICHEL

(FR)；克圖魯 阿布德薩塔 沙米 CHTOUROU, ABDESSATAR SAMI (FR)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

TW I268933

CN 102161701A

WO 94/25591A1

Ruiz SM et. al., "Expression and purification of recombinant rabbit factor VII", Thrombosis Research, vol.98, p.203-211, 2000/04/01

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：5 共 65 頁

(54)名稱

以基因轉殖合成的第七凝血因子之純化方法

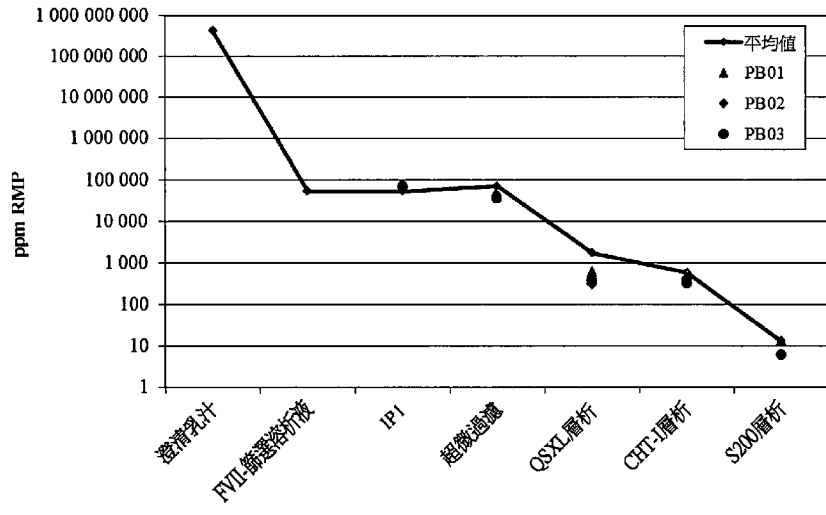
METHOD FOR PURIFYING TRANSGENIC FACTOR VII

(57)摘要

本發明係關於一種抗第七凝血因子之親和性配體(anti-Factor VII affinity ligand)，其對於純化基因轉殖合成的重組之活化態人類第七凝血因子特別有效。該親和性配體與其它正交層析法結合使用，能夠製備出高度純化、充分活化、無聚結體之第七凝血因子溶液，僅有微量的降解態或氧化態第七凝血因子。

The present invention relates to an anti-Factor VII affinity ligand that is particularly useful for purifying recombinant human activated Factor VII from transgenic sources. The affinity ligand combined with other orthogonal chromatographic steps allows the preparation of a highly purified FVII solution fully activated free of aggregates with a low percentage of degraded or oxidized FVII forms.

指定代表圖：



第 2 圖

發明摘要

※ 申請案號：102125684

※ 申請日：102.7.18

※IPC 分類：

C07K 1/32 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

以基因轉殖合成的第七凝血因子之純化方法 /METHOD FOR
PURIFYING TRANSGENIC FACTOR VII

【中文】

本發明係關於一種抗第七凝血因子之親和性配體 (anti-Factor VII affinity ligand)，其對於純化基因轉殖合成的重組之活化態人類第七凝血因子特別有效。該親和性配體與其它正交層析法結合使用，能夠製備出高度純化、充分活化、無聚結體之第七凝血因子溶液，僅有微量的降解態或氧化態第七凝血因子。

【英文】

The present invention relates to an anti-Factor VII affinity ligand that is particularly useful for purifying recombinant human activated Factor VII from transgenic sources. The affinity ligand combined with other orthogonal chromatographic steps allows the preparation of a highly purified FVII solution fully activated free of aggregates with a low percentage of degraded or oxidized FVII forms.

【代表圖】

10. 【本案指定代表圖】：第（2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

以基因轉殖合成的第七凝血因子之純化方法/METHOD FOR PURIFYING TRANSGENIC FACTOR VII

【技術領域】

【0001】本發明關於一種抗第七凝血因子之親和性配體 (anti-Factor VII affinity ligand)，其對於純化來自基因轉殖合成的人類重組活化態第七凝血因子特別有效。該親和性配體與其它正交層析法結合使用，能夠製備出高度純化、充分活化、無聚結體、具微量降解態或氧化態的第七凝血因子。

【先前技術】

【0002】第七凝血因子 (Factor VII, FVII) 係一種維生素 K 依賴型醣蛋白，其活化態 (FVIIa) 在鈣及組織因子的存在下，會參與凝血作用的過程，活化第十凝血因子及第九凝血因子。FVII 以具有 406 個胺基酸殘基之單肽鏈型態被分泌出來，其分子量大約為 50kDa。第七凝血因子包含四個獨特的結構域：一個 N-末端 γ -羧基域 (N-terminal gamma-carboxylic domain, Gla)、兩個「類表皮生長因子」域 (epidermal growth factor (EGF)-like domain)，以及一個絲胺酸蛋白酵素域 (serine protease domain)。FVII 透過斷開 Arg152-Ile153 域 (Arginine 152-Isoleucine 153) 之連結而成為活化態第七凝血因子 (FVIIa)。因此，FVIIa 具有一條含 152 個胺基酸之輕鏈 (分子量為大約 20kDa) 以及一條含 254 個胺基酸之重鏈 (其分子量為大

約 30kDa)之化合物，其輕重鏈彼此間透過一個雙硫鍵互相連結 (Cys135-Cys262)。

【0003】血漿中的 FVIIa 含有數個轉譯後修飾：最前端十個麩胺酸受到 [gamma]-羧基化，Asp6 受到局部羧基化，Ser52 (Serine 52)及 Ser60 (Serine 60)受到 O-糖基化並接上葡萄糖 (木糖)0-2 及海藻糖，Asn145 (Asparagine 145)及 Asn322 (Asparagine 322)主要透過雙觸雙唾液酸化之複合物結構，各自受到 N-糖基化。

【0004】FVII 係用於治療缺少第八凝血因子(A 型血友病)或第九凝血因子(B 型血友病)之血友病患者，以及缺少其他凝血因子之患者，例如先天缺乏 FVII。因此，取得可注射的 FVIIa 濃縮物是必要的。

【0005】得到 FVIIa 濃縮物的最古老方法，係從血漿分離而來之血漿蛋白進行純化，從而純化出 FVIIa。為此，EP 0 346 241 中描述了富含 FVIIa 餾分(fraction)之製備，藉由吸附而後溶析含有 FVII、FVIIa 及其他蛋白如第九凝血因子(FIX)、第十凝血因子(FX)、第二凝血因子(FII)，尤其是 PPSB (P=凝血酶原或第二凝血因子(FII)，P=前轉化素或第七凝血因子，S=司徒式因子或第十凝血因子(FX)，B=抗血友病因子 B 或第九凝血因子(FIX))的血漿蛋白餾分物之二級產物。此製程的缺點為，所得之 FVII 餾分內仍然含有某些含量的其他凝血因子。

【0006】同樣地，文件 EP 0 547 932 中亦描述了實質上不含維生素 K 依賴型因子及第八凝血因子(F VIII)之高純度 FVIIa 濃縮物之製造方法。透過此方法而得的 FVII，雖然純度高，但

顯示殘餘的致血栓性。

【0007】一般而言，上述方法中最主要的缺點之一在於，僅能產生少量的產物。而且，要得到完全不含其他血漿蛋白之產物仍然相當困難。最後，儘管爲了確保病毒與細菌安全性，而在製備血漿凝血因子的每一階段都實施了許多預防措施(爲了盡可能減少血液天生具有的病原體傳輸之風險，而進行捐血者後續追蹤、已知病毒及細菌汙染物之檢測、嚴格的純化，以及病毒去活性處理)，然而，仍無法排除所有的病原體污染之風險。而且，新變種庫賈氏症的出現，帶來了非傳統病原體透過血液產物傳輸之憂慮。再者，來自捐贈者的血漿量仍然有限。

【0008】因此，自 1980 年代起，編碼人類第七凝血因子之 DNA 被分離而出(Hagen 等人，Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83(8):2412-6)，並且在許多表現系統中被表現。

【0009】許多純化重組之第七凝血因子之方法已有更進一步的描述(例如 WO2009/141418)。目前通常透過一或兩種不同之多步驟過程，對重組之第七凝血因子多肽進行純化，可使用傳統樹脂之排阻層析法，或使用具有蛋白質配體的親和性樹脂之親和性層析法。

【0010】重組之第七凝血因子可以由發酵批次製造，或是由基因轉殖哺乳類製造。特別是由雌兔乳腺製造的 FVII 之組成，在例如專利申請案 WO2007/138199 中有所描述。基因轉殖哺乳動物的乳汁中所產生之 FVII，可透過例如切向過濾及層析，或是鈣沉澱之後進行數個層析步驟，而由乳汁純化而來。

【0011】然而可用之純化方法並非毫無缺點。尤其是在投

予人類患者後會觸發免疫抗原力的來自基因轉殖哺乳動物之原始蛋白，特別是來自基因轉殖哺乳動物之天然第七凝血因子，可能依然存在。

【發明內容】

【0012】本發明的目的之一，係自生物源材料純化基因轉殖第七凝血因子(transgenic Factor VII, TgFVII)及/或基因轉殖活化態第七凝血因子(transgenic activated Factor VII, TgFVIIa)之方法，其包含親和性層析步驟，該步驟包括：

(a)使含有 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之生物源材料，與對 TgFVII 及/或 TgFVIIa 具有專一性之配體，在允許 TgFVII 及/或 TgFVIIa 與該配體結合之條件下，互相接觸，以及

(b)利用非破壞性方式擾亂與該配體的交互作用，回收 TgFVII 及/或 TgFVIIa。

【0013】本發明之一實施例中，該配體為導向 TgFVII 及 TgFVIIa 之至少一個的抗原決定位、功能性片段或其衍生物之抗原結合蛋白。該配體較佳包含形成兩個完全抗原結合位之兩條重多肽鏈，且不具輕多肽鏈，其衍生自駱駝科的重免疫球蛋白鏈。

【0014】在一實施例中，本發明之該方法中，步驟(b)包含至少一個洗滌步驟，在將 TgFVII 或 TgFVIIa 溶析離開該配體之前，將未結合之材料移除，更可選擇性包含二次洗滌步驟，以移除結合在樹脂上且親和力低於 TgFVII 或 TgFVIIa 之污染物。

【0015】本發明之一實施例中，用於純化 TgFVII 或

TgFVIIa 之生物源材料，係取自於生產 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之基因轉殖動物。較佳之該動物為雌性哺乳類，且較佳者為雌兔，且該生物源材料為乳汁。

【0016】在一實施例中，本發明之方法更包含在步驟(a)之前收集與澄清乳汁的初步步驟。乳汁澄清步驟較佳為添加檸檬酸鹽而後進行過濾。

【0017】在一實施例中，本發明之方法更包含步驟(c)於離子交換器中，較佳者為陰離子交換器，在 TgFVII 及/或 TgFVIIa 留存於該離子交換器之條件下，對該溶析出之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 進行層析純化。此步驟較佳用於活化 TgFVII 及精製化(polishing)TgFVII 及/或 TgFVIIa。

【0018】在一實施例中，本發明之方法更包含步驟(d)於偽親和性樹脂中，較佳者為羥磷灰石，在 TgFVII 及/或 TgFVIIa 留存於該偽親和性樹脂的條件下，對該溶析出之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 進行層析分離。此步驟較佳用於精製化 TgFVII 及/或 TgFVIIa 及控制 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之降解。

【0019】在一實施例中，本發明之方法更包含步驟(e)於粒徑篩析載體中，對該溶析出之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 進行層析分離。此步驟較佳用於精製化及配製 TgFVII 及/或 TgFVIIa。

【0020】在一實施例中，本發明之方法更包含至少一個將病毒去除及/或去活化之步驟，較佳之方式為超微過濾及/或溶劑/清潔劑處理。

【0021】在一實施例中，本發明之方法更包含配製、滅菌及冷凍乾燥該純化之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之最終步驟。

【0022】在一實施例中，在親和性層析步驟中，本發明之方法更包含下列步驟：

(a)將取自於含有重組產生的 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之基因轉殖雌兔的乳汁，注入固定有如上定義之配體的層析樹脂中，在允許該配體與 TgFVII 及/或 TgFVIIa 結合之條件下；

(b1)洗滌未結合之材料；

(b2)洗滌親和力低於 TgFVII 或 TgFVIIa 之汙染物；以及

(b3)從該樹脂中溶析出 TgFVII 及/或 TgFVIIa。

【0023】在一實施例中，於本發明之方法的親和性層析步驟中，上述移除弱結合材料的二次洗滌步驟係以包含 10%至 50%疏水劑、且其離子強度範圍為 200mM 至 600mM 之緩衝液來進行。

【0024】在一實施例中，於本發明之方法的親和性層析步驟中，上述自該樹脂溶析出 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之溶析步驟係以包含 20%至 70%疏水劑、且其離子強度範圍為 500mM 至 2500mM 之緩衝液進行。

【0025】本發明之特徵及優點根據下述之實施態樣、非限定之實例及後列圖式，將更明確。

【圖式簡單說明】

【0026】

第 1 圖為駱駝科免疫球蛋白 IgG1、IgG2 及 IgG3 之型態示意圖，該些免疫球蛋白具有重多肽鏈而不具輕鏈。

第 2 圖為本發明之方法中 RMP 清除量之示意圖。RMP 水平做為該過程之該步驟的函數，以 ppm 為單位。

第 3 圖為本發明之方法中 DNA 清除量之示意圖。DNA 水平做為該過程之該步驟的函數，以 ppb 為單位。

第 4 圖顯示在純化過程中 TgFVII 之活化。Lane 1 至 9 各自對應於以下所述：lane 1 及 lane 9：分子量；lane 2：澄清乳汁；lane 3：FVII-篩選之溶析液(對本發明之該配體進行親和性層析之後)；lane 4：中間產物 1(進行超過濾及透析過濾之後)；lane 5：超微過濾液；lane 6：QSXL 溶析液；lane 7：CHT-I 溶析液；lane 8：SEC 池。

第 5 圖為預濾及溶劑/清潔劑處理步驟後之樣本(樣本命名為 Initial Load)，以及親和性 FVII 篩選層析步驟後之樣本(樣本命名為 Eluate A)中病毒載量之直方圖。

【實施方式】

基因轉殖第七凝血因子或活化態第七凝血因子

【0027】本發明之純化方法基於對基因轉殖第七凝血因子(TgFVII)及/或基因轉殖活化態第七凝血因子(TgFVIIa)具有專一性親和力的配體之使用。

【0028】本發明中所使用的該基因轉殖第七凝血因子及活化態第七凝血因子的胺基酸序列為已知。該基因轉殖第七凝血因子之胺基酸序列，例如 U.S. Patent No. 4,784,950 中所公開，與人類第七凝血因子相同。

生物源材料

【0029】本發明之方法對於純化獲得自多種生物性來源的基因轉殖 FVII 及/或 FVIIa 之純化格外有用，此生物性來源於本文中稱為「生物源材料」。

【0030】本發明之一實施態樣中，該生物源材料包含基因轉殖 FVII 及/或 FVIIa，獲得自能產生基因轉殖 FVII 及/或 FVIIa 之基因轉殖動物(或該經過改造之動物的後代)的體液分餾(fractionation)。基因轉殖動物較佳為哺乳動物，例如牛、兔、山羊、綿羊等。含有 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之生物源材料較佳為哺乳動物乳汁之樣本，例如，乳汁中產生基因轉殖 FVII 及/或 FVIIa 的基因轉殖哺乳動物的乳汁之樣本。

【0031】令基因轉殖動物於乳汁中產生基因轉殖 FVII 蛋白的方法，可包含下列步驟：將合成的 DNA 分子轉移進入非人之哺乳動物的胚胎，該 DNA 分子含有編碼基因轉殖 FVII 之基因(其胺基酸序列對應於人類 FVII 之序列)，且該基因受天然分泌於乳汁中之蛋白的啓動子控制。該胚胎接著被植入同物種之雌性哺乳動物體內，接著誕生成為基因轉殖動物。一旦該基因轉殖動物充分發育後，誘使其泌乳並收集其乳汁。於是該乳汁含有所欲之重組蛋白。在 EP 0 527 063 中提供了製備非人之雌性哺乳動物乳汁中的基因轉殖 FVII(TgFVII)之方法實例。在該特定之實施例中，透過引入含有 WAP 基因啓動子之序列，製造出含有 WAP 啓動子之質體，且該質體被製造成能夠接受表現 WAP 啓動子依賴性之外來基因。該編碼出基因轉殖 FVII 之基因被導入並表現出 WAP 啓動子依賴性。此含有啓動子之質體以及編碼基因轉殖 FVII 蛋白之基因使用於獲得基因轉殖動物，例如兔，透過顯微注射注入兔胚胎之雄原核。此胚胎接著被轉移至以激素預備(hormonally prepared)之雌性動物的輸卵管。

純化方法

【0032】本發明提供純化基因轉殖 FVII 及/或 FVIIa 之方法。此方法特別包含使含有 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之生物源材料與對 TgFVII 及 TgFVIIa 具高度專一性之配體互相接觸。

【0033】由基因轉殖兔之乳汁中製造基因轉殖 FVII 或 FVIIa 之方法會造成許多必須被去除的雜質產生。本發明之方法特別設計從基因轉殖兔之乳汁中純化出基因轉殖 FVII 或 FVIIa，同時移除伴隨的汙染分子，亦稱宿主相關雜質 (Host Related Impurities, HRI)，包含兔乳蛋白 (Rabbit Milk Proteins, RMP)，亦具有兔 DNA 及會汙染兔乳汁的其他分子，例如兔血清蛋白。殘餘的血清蛋白 (例如白蛋白、兔之 FVII、免疫球蛋白及運鐵蛋白) 可能透過血液往乳汁方向之被動性滲漏，而進入該乳汁源材料。

【0034】乳汁確實對應於含有可溶性乳清蛋白、不溶性酪蛋白微團及乳脂肪球的非無菌之膠狀懸浮液。由乳腺上皮細胞合成並分泌之 TgFVII，於可溶性乳清餾分中發現。潛在汙染性 RMP 包含，但不限於：酪蛋白 (caseins)、乳白蛋白 (lactalbumin)、乳球蛋白 (lactoglobulin)，以及乳鐵蛋白 (lactoferrin)。五種族類蛋白質：運鐵蛋白 (transferrin)、酪蛋白 (casein)、白蛋白 (albumin)、乳清酸蛋白 (whey acid protein)，以及免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)，大約佔兔乳蛋白總量 90%。

【0035】而且，在本發明之一實施例中，本發明之純化方法亦設計用於使乳汁中的酶原 TgFVII 活化成爲 TgFVIIa。不

幸地，一旦被活化後，TgFVIIa 即變得對補充裂解 (supplementary cleavage) 敏感。TgFVII 及/或 TgFVIIa 裂解導致 TgFVII 局部或完全地失去富含 Gla 之區域，或導致輕鏈(LC) 或重鏈(HC)之裂解，從而限制該分子的效能。因此在過程中，有可能發生 TgFVIIa 降解成非活性裂解產物，或是 TgFVII 氧化等現象，而為了確保 FVII 之治療適合性，必須去除這些現象。

澄清作用

【0036】乳汁的澄清作用為前期的乳汁處理，可選擇性地進行如專利申請案 WO2007/138198 或 WO2008/099077 中所描述之程序，但在應用於本發明之前，乳汁的處理並無限制。澄清作用也可選擇性略過，例如當該方法之第一步驟係透過流體化床進行親和性捕捉。使用製乳產業中任何可行之技術進行脂肪傾析或脫脂分離亦可選擇性地在純化步驟之前進行。在本發明之一實施態樣中，乳汁較佳與檸檬酸緩衝液混合，以快速得到穩定的似血漿態之乳汁，然後透過例如離心或傾析等液相分離，隨後進行深度過濾，從而得到脂肪分離的效果。在本發明之一實施態樣中，為了製備 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之完全生物活性分子，較佳之方式為透過組合低剪應力、非氧化性技術，快速減少初始污染菌及利用尺寸滯留來自收集之乳汁之相關雜質，有利地進行深度過濾。在此實施例中，深度過濾器相關之孔徑範圍由 30 μm 至 0.1 μm ，該深度過濾較佳依順序進行 25 μm 至 0.5 μm 孔徑過濾，接著進行 0.5 μm 至 0.1 μm 孔徑過濾。以纖維素為基底之深度過濾器，不論有無顆粒佐劑或其他助濾

劑化合物，皆能良好地適應於此步驟。在本發明之一實施態樣中，該檸檬酸鹽之濃度範圍由 0.15M 至飽和，該過程溫度之範圍由 15°C 至 30°C，較佳為該檸檬酸鹽之濃度範圍由 0.2M 至 0.5M，該過程溫度由 22°C 至 27°C。為了維持在微米等級下乳汁蛋白的族群大小，以及得到純淨之似血漿態溶液，檸檬酸鹽及溫度之組合係必要的。「純淨(clear)」係指本發明之方法中，澄清之乳汁顯示控制於 500NTU(normalized turbidity unit，規一濁度單位)以下之濁度，或分光光度計在 λ 為 400 奈米時測得之光密度在 1000AU(relative absorbance unit，相對吸收度單位)以下。

【0037】在這些情況下，可以有利地實施孔徑 0.2 μ m 之薄膜過濾，以減少這些蛋白的生物性來源中的初始污染菌電荷 (Bioburden charge)。

【0038】所得的初始污染菌減少且穩定之溶液，可選擇性儲存於 -20°C 以下之低溫中長達數月。

專一性配體之親和性層析

配體

【0039】本發明之從生物源材料純化出 TgFVII/TgFVIIa 之方法，包含至少一個以對 TgFVII 及/或 TgFVIIa 具有專一性之配體的親和性層析之分離步驟。

【0040】在本發明之一實施態樣中，前述之親和性配體係分離之抗原結合蛋白，包含兩條組成完整之一或多個抗原結合位的重多肽鏈，而且沒有輕多肽鏈。因此，本發明之方法所使用之抗原結合蛋白，通常由重鏈之二聚體所組成，且缺乏輕

鏈。該兩條重多肽鏈足以構成一或多個完整之抗原結合位。根據本發明，「一個完整之抗原結合位」係指一個位置，能夠獨自對一個抗原進行辨認以及與之完整結合，可透過任何已知有關測試結合親和力之方法驗證。

【0041】本發明之方法所使用的抗原結合蛋白之重鏈，不具有與相對應之輕鏈(其不存在)互動之特色，因而與普通的免疫球蛋白之重鏈截然不同。儘管具有特殊結構，與標準之四鏈型態免疫球蛋白相比時，前述抗原結合蛋白仍然能夠表現出其至少相等、較佳為增強之功能特質。因此，該由重鏈構成之前述抗原結合蛋白，本質上更適合由原核細胞及低等真核細胞分泌。

【0042】在一特定之實施態樣中，本發明之方法中，做為親和性配體使用的抗原結合蛋白之特色為，其重多肽鏈包含一變異區(variable region, VH)以及一恆定區(constant region, CH)，但缺乏恆定區的第一區域(稱為 CH1)。因此，這些不具 CH1 區域之抗原結合蛋白，其鏈上之變異區直接連接於變異區 C-末端部分之鉸鏈區(hinge region)。WO 94/25591 中公開了大規模製備這些重鏈抗體或其片段之方法，包含透過編碼出上述抗體或片段的可表現 DNA 序列轉形黴菌或酵母。在本發明之一實施態樣中，上述之抗原結合蛋白亦能透過 WO 94/04678 中所述之方法獲得。

【0043】本發明之該方法所使用之該重鏈免疫球蛋白的變異區，不具正常該有之與 VL 或 CH1 區域相互作用之位置，即該重鏈免疫球蛋白不存在與 VL 或 CH1 區域相互作用之位置。

該些免疫球蛋白亦為文獻中普遍所指之「VHH」。

【0044】在一實施例中，本發明之該方法中，該些做為配體使用的抗原結合蛋白之特色為，其變異區第 45 位具有不同於白胺酸(leucine)、脯胺酸(proline)或麩醯胺酸(glutamine)之胺基酸殘基。

【0045】在一特定之實施例中，本發明之該方法中，該些做為親和性配體使用的抗原結合蛋白之特色為，其變異區包含框架(frameworks, FW)及互補決定區(complementarity determining regions, CDR)，尤其係 4 個框架及 3 個互補決定區。該些抗原結合蛋白因此有別於標準之四鏈型態免疫球蛋白，尤其係因為其變異區本身即能包含一或數個抗原結合位，無需輕鏈變異區之協助。

【0046】框架 1 及框架 4 之胺基酸序列，包含分別自下列所述之序列擇一：

框架 1 區域之序列：

GGSVQTGGSLRLSCEISGLTFD (SEQ ID NO: 1)

GGSVQTGGSLRLSCAVSGFSFS (SEQ ID NO: 2)

GGSEQGGGSLRLSCAISGYTYG (SEQ ID NO: 3)

GGSVQPGGSLTLCTVSGATYS (SEQ ID NO: 4)

GGSVQAGGSLRLSCTGSGFPYS (SEQ ID NO: 5)

GGSVQAGGSLRLSCVAGFGTS (SEQ ID NO: 6)

GGSVQAGGSLRLSCVVSFSPSS (SEQ ID NO: 7);

框架 4 區域序列：

WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 8)

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)
 WGQGAQVTVSS (SEQ ID NO: 10)
 WGQGTQVTASS (SEQ ID NO: 11)
 RGQGTQVTVSL (SEQ ID NO: 12)及/或，
 CDR3 區域序列
 ALQPGGYCGYGX-----CL (SEQ ID NO: 13)
 VSLMDRISQH-----GC (SEQ ID NO: 14)
 VPAHLGPGAILDLKKY-----KY (SEQ ID NO: 15)
 FCYSTAGDGGSGE-----MY (SEQ ID NO: 16)
 ELSSGSCSELPLLF-----DY (SEQ ID NO: 17)
 DWKYWTCGAQTGGYF-----GQ (SEQ ID NO: 18)
 RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY (SEQ ID NO: 19)
 QKKDRTRWAEPREW-----NN (SEQ ID NO: 20)
 GSRFSSPVGSTSRLES-SDY—NY (SEQ ID NO: 21)
 ADPSIYYYSILXIEY-----KY (SEQ ID NO: 22)
 DSPCYMPTMPAPPIRDSEFGW—DD (SEQ ID NO: 23)
 TSSFYWYCTTAPY-----NV (SEQ ID NO: 24)
 TEIEWYGCNLRRTTF-----TR (SEQ ID NO: 25)
 NQLAGGWYLDPNYWLSVGAY—AI (SEQ ID NO: 26)
 RLTEMGACDARWATLATRTFAYNY (SEQ ID NO: 27)
 DGWTRKEGGIGLPWSVQCEDGYNY (SEQ ID NO: 28)
 DSYPCHELL-----DV (SEQ ID NO: 29)
 VEYPIADMCS-----RY (SEQ ID NO: 30)

【0047】 在一實施例中，該包含 CH2 及 CH3 區域之抗原結

合蛋白的恆定區，包含自下列序列群組擇一之胺基酸序列：

CH2 區域之序列：

APELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTP (SEQ ID NO: 31)

APELPGGPSVFVFPTKPKDVLSISGRP (SEQ ID NO: 32)

APELPGGPSVFVFPPKPKDVLSISGRP (SEQ ID NO: 33)

APELLGGPSVFIFPPKPKDVLSISGRP (SEQ ID NO: 34)

CH3 區域之序列：

GQTREPQVYTLA (SEQ ID NO: 35)

GQTREPQVYTLAPXRLEL (SEQ ID NO: 36)

GQPREPQVYTLPPSRDEL (SEQ ID NO: 37)

GQPREPQVYTLPPSREEM (SEQ ID NO: 38)

GQPREPQVYTLPPSQEEM (SEQ ID NO: 39)

【0048】較佳之該抗原結合蛋白的特色係其鉸鏈區包含 0 至 50 個胺基酸。該些蛋白的鉸鏈區之特定區域為下列之序列：

GTNEVCKCPKCP (SEQ ID NO: 40)或

EPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP (SEQ ID NO: 41)

【0049】該短鉸鏈區之序列對應於一個 IgG3 分子，而該長鉸鏈區之序列對應於一個 IgG2 分子。

【0050】在一特定之實施例中，本發明之該方法中，該些做為配體使用的抗原結合蛋白可自動物分離而來，特別係分離自駱駝科動物，且較佳者為分離自駱駝科動物之血液。在更進一步之實施例中，該些抗原結合蛋白係衍生自駱駝科之免疫球蛋白，特別係衍生自舊世界駱駝(雙峰駱駝 *Camelus bactrianus*

及單峰駱駝 (*Camelus dromedarius*)或新世界駱駝(羊駝 *Lama pacos*、駱馬 *Lama glama* 及瘦駝 *Lama vicugna*)。根據其所源自之動物，該些抗原結合蛋白之分子量可由大約 43kDa 至大約 47kDa，特別是 45kDa。

【0051】在一實施例中，藉由以一種人類抗體之全部或局部之恆定區，取代該些抗原結合蛋白之全部或局部之恆定區，可使該些抗原結合蛋白受到修改，特別係人源化。舉例而言，可用人類免疫球蛋白 IgG $\gamma 3$ 之 CH2 及/或 CH3 區域，取代前述之抗原結合蛋白之 CH2 及/或 CH3 區域。在該人源化之抗原結合蛋白中，變異序列之一部分，特別係一或多個不會涉入結合位之框架殘基，亦能以人類抗體框架殘基取代之。前述之抗原結合蛋白可包含 G 型免疫球蛋白，尤其係定義為 class 2(IgG2) 或 class 3(IgG3)之免疫球蛋白。

【0052】上述之該些抗原結合蛋白之優點，係在於其缺少輕鏈之變異區，即意味著，不存在由配對不同組合之變異區的可能性而造成之抗體庫之變異性額外維度，因此製備針對於一種特定抗原(此為基因轉殖 FVII/FVIIa)之抗原結合蛋白，同時避免產生大量不相干之抗原結合蛋白是可能的。第二個優點，係 VHH 區域比起傳統之抗體，被證實為顯著地更加穩定，因此預期使用前述之抗原結合蛋白之層析分離將有顯著地更強之效果。更進一步，缺少為了維持結構及功能完整性而與輕鏈之變異區互動的依賴性，令該些 VHH 區域在易於生產以及溶液中效能之方面，大幅優於其他小抗體片段。尤其，VHH 片段係格外適合免疫-親和純化作用之分子，因為其不一般的穩定

性及完全變性(經常發生於抗體溶析過程中)後高效率的重新摺疊能力。

【0053】當本發明之該方法中所使用之該親和性配體為如前述定義之抗原結合蛋白時，其可針對於基因轉殖 FVII/FVIIa 之任何抗原表位，即前述之抗原表位係專一於基因轉殖 FVII/FVIIa。該些抗原表位包含任何由胺基酸、多肽、碳水化合物，或其混合物所組成之結構。

【0054】「專一於基因轉殖第七凝血因子/活化態第七凝血因子之配體」係指本發明之親和性層析步驟中所使用之配體，其不會大幅度地結合於其他蛋白，即大幅度地限制與任何其他蛋白結合，包含來自其他物種之 FVII 或 FVIIa，例如兔或山羊之 FVII 或 FVIIa。本發明中所使用之配體，較佳者為具有對基因轉殖 FVII 或 FVIIa 高於 1 μ M 之親和力，且能有利地具有至少 100 nM 之親和力，更佳者為具有對基因轉殖 FVII 或 FVIIa 介於 1 nM 至 10 nM 之親和力。在特定之實施例中，本發明中所使用之該配體與第 FVII 或 FVIIa 結合時，相較於兔之 FVII 或 FVIIa，有大於 1 log 之差異。「大幅度地限制與蛋白結合」係指本發明中所使用之該配體，能夠將裝載於層析載體上的初始溶液中所含之宿主相關雜質(HRI)移除至少 4 logs 或 99.99%，以及將表現基因轉殖 FVII 的基因轉殖哺乳動物所內源性生產之 FVII 或 FVIIa 蛋白移除至少 3 logs 或 99.9%。

【0055】在一實施例中，溶析自親和性載體之內源性第七凝血因子或活化態第七凝血因子餾分的質量，相對於裝載於管柱之初始溶液中該些蛋白之質量，減少了 100 倍，較佳者為

1000 倍，或尤佳者為 10000 倍或更多。相較於初始裝載溶液中該些蛋白之質量，裝載於該 FVII-專一性配體上、以及自溶析餾分回收之基因轉殖第七凝血因子或活化態第七凝血因子，其相對質量至少為 30%，較佳者至少為 50%或更多。

【0056】在一特定之實施例中，本發明之該抗原結合蛋白(配體)具有下列動能結合常數： $K_a = 2.58 \times 10^8 \text{ M}$ 及 $K_d = 9.88 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

【0057】任何上述之抗原結合蛋白的功能性片段或功能性衍生物，亦能於本發明之該方法中，坐為專一性結合於基因轉殖第七凝血因子及/或活化態第七凝血因子之配體使用。

【0058】上述之抗原結合蛋白的「功能性片段」係指一片段，相較於抗原結合蛋白之來源者本身的 FVII 和 FVIIa，顯示出對人類 FVII 或 FVIIa 具有較強之親和力，且較佳者為具有與人類 FVII 或 FVIIa 實質上相等之親和力，其親和力強過抗原結合蛋白之來源者本身表現之親和力至少 50%，仍佳者為至少 60%、70%、80%或 90%。

【0059】本發明之該方法中，做為配體使用之該些片段，包含一抗原結合蛋白之一條重多肽鏈且不具輕鏈，透過酵素性分解上述抗原結合蛋白而獲得之片段，特別係該些透過木瓜酵素(papain)局部分解而得到之 Fc 片段(恆定片段)及 FVHh 片段(含有重鏈之抗原結合位)或其二聚體 $F(VHh)_2$ ，或是由木瓜酵素對 Fc 片段更進一步分解，而得到對應於 Fc 片段 C-末端部分的 pFc 片段、透過其他蛋白水解酵素而得到的同源片段、至少具有抗原結合蛋白之變異區的 10 個胺基酸，較佳者為 20 個胺

基酸，的片段、或具有完整變異區，尤其是一對應於該分離之 VH 區域或對應於與鉸鏈區連結之 VH 二聚體的片段，以及至少具有 10 個與該抗原結合蛋白恆定區相同之胺基酸，較佳者為 20 個相同之胺基酸，或具有抗原結合蛋白完整恆定區的片段。

【0060】「功能性衍生物」係指一多肽，不同於本發明之該方法中做為配體使用的抗原結合蛋白，其有一個或數個被置換、消除或增加之胺基酸，該衍生物顯現對基因轉殖 FVII 或 FVIIa 之結合親和力與專一性。該「功能性衍生物」，較佳者為顯示實質上與基因轉殖 FVIIa 相同之親和力，其親和力強過上述之抗原結合蛋白表現之親和力至少 90%，仍佳者為至少 50%、60%、70%或 80%。前述之功能性衍生物包含同源衍生物，其高比例一致於上述之抗原結合蛋白，兩者間至少有 80%、85%、90%、95%或 99%一致性，且較佳者為與上述之抗原結合蛋白有一個或數個保守性置換之差異。

【0061】在本發明之一實施例中，該抗原結合蛋白係固定於固相上。固定作用可透過吸附作用或化學交聯作用達成。

【0062】藉由暴露該固相之表面於該蛋白之溶液中，使得該蛋白藉由非專一性結合機制吸附上該固體之表面，而使得蛋白能夠附著到固體表面上，例如層析介質。將蛋白固定於層析介質上之方法已於文獻中廣被確認，參見例如 Boschetti E., Egly J.M., Monsigny M., 1983, Practical Guide for use in Affinity chromatography and related techniques, 2nd edition, IBF Villeneuve-la-garenne, France, 頁 1-157。舉例而言，該固

體表面係由一疏水性材料例如聚苯乙烯所構成，接著藉由疏水區域對該蛋白之吸附作用，令該蛋白附著到疏水性表面上。

【0063】該用於吸附固定蛋白表面預備劑中之蛋白的方法，有可行之替代或改進方法。

【0064】另一種替代方法，係利用該蛋白中殘基之化學交聯作用，以與使用傳統(常規)耦合化學的活化之固體表面產生共價性附著，例如在 Boschetti E., Egly J.M., Monsigny M., 1983, *Practical Guide for use in Affinity chromatography and related techniques*, 2nd edition, IBF Villeneuve-la-garenne, France, 頁 1-157 中即有所描述。包含硫氫基，例如半胱胺酸，之胺基酸殘基，能透過使用雙特異性試劑例如琥珀醯亞胺基-馬來醯亞胺基苯基丁酯(SMPB)，而產生共價性附著。

【0065】另外，透過使用 1-乙基-3-[3-二甲基胺基丙基]碳二醯亞胺(EDC)及 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)之傳統的碳二亞胺耦合作用，位於該配體表面之離胺酸基能被耦合以活化該固體表面之羧基。亦能透過使用一延伸型態之肽尾端，藉由非共價性吸附作用而將該配體固定於該固相，或透過使用傳統之化學交聯試劑而附著該配體。

【0066】根據本發明之一實施例，本發明之該抗原結合蛋白，藉由使用傳統耦合化學之共價性交聯而附著於固相之上。該固相可自然地包含適合共價性附著的可交聯之殘基，或根據本發明所屬領域中熟知之技術，其可被塗覆或進行衍生，以引入合適之可交聯基。

【0067】該固定作用發生之固相，可由許多種類的材料提

供，且可為任何合適之傳統的用於固定蛋白的固相載體材料。本發明之該方法可適用於任何能夠承受，無論是直接或預先處理後，該些蛋白或蛋白片段之固定作用的固相材料。該載體材料可為顆粒狀(例如小珠或顆粒，普遍使用於萃取柱)或為片狀(例如薄膜或過濾器、玻璃片或塑膠片、微量檢測盤、試紙、毛細填充裝置，或諸如此類)，其可為扁平、摺疊，或中空之纖維或管柱。下列範例並未詳列所有基質，此些實例包含矽石(多孔性無定形之矽石)，例如由 Biotage(Dyax 公司旗下之一部門)提供，含有 60A 不規則形矽石(32-63 μm 或 35-70 μm)之 FLASH 系列的卡匣、洋菜糖或聚丙醯胺載體，例如由 Amersham Pharmacia Biotech 提供之 Sepharose 範圍內之產品、或由 Bio-Rad 所提供之 Affi 凝膠載體。此外，尚有大孔聚合物，例如同樣由 Bio-Rad 所供給之壓力穩定 Affi-Prep 載體。其他可利用之載體包括：葡聚糖(dextran)、膠原蛋白(collagen)、聚苯乙烯(polystyrene)、甲基丙烯酸(methacrylate)、褐藻酸鈣(calcium alginate)、可控孔徑玻璃(controlled pore glass)、鋁(aluminium)、鈦(titanium)，以及多孔陶瓷(porous ceramics)。在一較佳之實施例中，將樹脂做為該固相使用，包含商業用樹脂例如 Sephadex®、Sepharose®、Fractogel®、CIMGEL®、Toyopearl®、HEMA®，以及交聯洋菜糖、大孔之聚苯乙烯或聚丙烯酸酯(polyacrylate)。該固相亦可主要為一無機天然物，例如大孔玻璃或黏土礦物，或樹脂及無機物之組合，例如陶瓷製 HyperD®或矽膠。

【0068】裝載步驟

【0069】該包含基因轉殖 FVII/ FVIIa 之生物源材料，可在裝載至包含上述配體之親和性載體之前，選擇性地進行預先處理(例如澄清或過濾步驟)。

【0070】該生物源材料，較佳為在裝載至包含該配體之親和性載體前先進行調整。在本發明之一實施例中，該載樣緩衝液之 pH 值調整至由大約 6.0 至 8.0。為了本發明之此層析步驟，合適之載樣緩衝液通常對應於包含緩衝劑之水溶液，其緩衝劑通常為磷酸鹽、檸檬酸鹽，或參緩衝劑(tris)。儘管如此，亦能使用所有 pK 值接近中性之羧酸緩衝液或兩性離子緩衝液。可添加由 0 至 50mM 之二價離子，例如鈣、鎂、鋅等，至該載樣緩衝液中(最終濃度)。

【0071】該裝載步驟通常在每小時 10 至 72 管柱容積(column volumes, CV)，較佳者為 18 至 54 CV/小時之流率下進行。在某些實施例中，該裝載流率之範圍由 30 至 48 CV/小時，較佳者為 36 CV/小時。該些特定之流率範圍允許該配體與基因轉殖 FVII/ FVIIa 有充足的接觸時間，但不會過久以至形成一非解離性複合物。

【0072】在本發明之一實施例中，該裝載之材料在裝載上管柱之後會進行沖洗，直到溶析出該些非專一性結合物及汙染物。

【0073】第一洗滌步驟- 移除未結合材料

【0074】在本發明之一實施例中，進行第一洗滌步驟，以溶析出裝載溶液中之未結合材料。前述之第一洗滌步驟較佳者為使用 pH 值之範圍由 2 至 9 的洗滌緩衝液。在某些實施例中，

根據其所使用之親和性樹脂，第一洗滌緩衝液之 pH 值之範圍由 3 至 10、由 3 至 7、由 5 至 9、由 6.5 至 8.5，或由 6.5 至 10.0。在某些有趣的實施例中，第一洗滌緩衝液之 pH 值之範圍由 4.0 至 7.0、由 7.0 至 9.0，或由 4.5 至 8.5。

【0075】進行第一洗滌步驟時，可藉由該些 pH 值在特定範圍內之緩衝液，來減少存在於源材料中之污染蛋白及固定配體中的微弱相互作用。利用靜電排斥作用，有利於溶析出弱結合蛋白。

【0076】第一洗滌步驟通常在每小時 10 至 72 管柱容積 (CV)，較佳者為 18 至 54 CV/小時之流率下進行。某些實施例中，該洗滌流率之範圍由 30 至 48 CV/小時，較佳者為 36 CV/小時。在本發明之一實施例中，第一洗滌緩衝液為包含緩衝劑之水溶液，其緩衝劑通常為磷酸鹽或 Tris。儘管如此，亦能使用所有 pK 值接近中性之羧酸緩衝液或兩性離子緩衝液。

【0077】在一實施例中，該第一洗滌緩衝液包含 0 至 100mM，較佳者為 50mM 之 Tris 緩衝液，其 pH 值介於 6.5 至 8.5 之間，尤佳者為 pH 值 7.5。

【0078】應當知曉，該洗滌步驟可藉由使用一、二或數種不同之洗滌緩衝液，或是藉由應用梯度洗滌緩衝液來進行延伸。

【0079】第二洗滌步驟-移除弱結合材料

【0080】在本發明之一實施例中，在對 TgFVII/ TgFVIIa 進行溶析之前，有利地應用第二洗滌緩衝液，以去除結合於樹脂上但親和性弱於 TgFVII 或 TgFVIIa 之污染物。在一實施例中，

該第二洗滌緩衝液包含一個醚二醇化合物及至少一種可溶性鹽類。

【0081】在本發明之一實施例中，該第二洗滌緩衝液之離子濃度隨著氯化鈉或離液鹽類，例如鎂，而增加。在一實施例中，該離子強度隨著離子成分而增加，例如，單價或多價之陰離子及/或陽離子鹽類。在一實施例中，該離子強度或離子濃度之範圍由 200 至 600 mM，更佳者為由 300 至 500 mM 或由 350 至 450 mM。與此同時，該緩衝液之疏水性隨著疏水劑而增加，例如乙二醇或丙二醇。在一實施例中，該第二洗滌緩衝液中疏水劑之比例，範圍由 10%至 50%、由 20%至 40%，且較佳者為由 25%至 35%。

【0082】「弱結合材料」係指該第二洗滌步驟引發某些材料的移除，該些材料對本發明之該方法中所使用的親和性配體之具有親和力(K_d)至少為 $100\mu\text{M}$ ，較佳者為至少 $10\mu\text{M}$ 。

【0083】在一實施例中，該第二洗滌緩衝液之離子及疏水性強度一起增加，盡可能移除越多結合於親和性樹脂上之汙染物越好，較佳者為全部移除。

【0084】該第二洗滌緩衝液較佳者為包含 pH 值範圍由 6.5 至 8.5 之參緩衝液，其具有 0 至 40%之乙二醇醚以及由 0 至 0.5 M 之鈉鹽類。在一較佳之實施例中，該第二洗滌緩衝液包含 pH 值 7.5 之 Tris 緩衝液，其具有 30%之丙二醇以及 0.4M 之氯化鈉。

【0085】亦應注意，第二洗滌步驟及溶析步驟不需為離散的步驟，甚至可以結合使用，特別是當溶析步驟中使用梯度溶

析緩衝液時。

【0086】 溶析步驟

【0087】 在該(些)洗滌步驟之後，使用溶析緩衝液，溶析出結合在親和性管柱配體上之 TgFVII/ TgFVIIa，並收集純化的 TgFVII 及/或 TgFVIIa 溶液做為溶析液。人類 FVII 或 FVIIa 之脫附作用，較佳之進行方式為透過改變物理化學條件，令該抗原結合配體不再與人類 FVII 或 FVIIa 結合。溶析作用可透過改變該些關於 pH 值、鹽份、溫度或任何其他適當作法的條件而達成。

【0088】 「以非破壞性方式擾亂與該配體間之相互作用」係指在對前述之基因轉殖 FVII 型態進行溶析作用時，保留該 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之完整性與功能性。

【0089】 在一實施例中，溶析作用係使用 pH 值低於 3.0 之緩衝液，但其必須能快速中和至 pH 值超過 6.0，以維持溶析出分子之生物活性。

【0090】 該溶析緩衝液通常為包含緩衝劑之水溶液，其緩衝劑通常為磷酸鹽或 Tris。儘管如此，亦能使用所有 pK 值接近中性之羧酸緩衝液或兩性離子緩衝液。該溶析步驟較佳者為使用一 pH 值範圍由 2 至 10 之溶析緩衝液。在某些實施例中，其 pH 值之範圍由 3 至 9、由 5 至 8，尤佳者為由 7 至 8。靜電排斥之相互作用不足以擾亂 TgFVII 或 TgFVIIa 與配體間之專一親和性相互作用。該溶析緩衝液可更有利地包含任何額外成份，能維持該 TgFVII/ TgFVIIa 之生物活性，但不會失去轉換後轉型(post-translational transformation)，例如糖化作用，或

避免聚結作用或氧化作用。

【0091】較佳地，該溶析緩衝液之離子強度隨著氯化鈉或離液鹽例如鎂而增加。在一實施例中，該溶析緩衝液之離子強度之範圍由 500 至 2500 mM、由 1000 至 1800 mM，或較佳者為由 1200 至 1600 mM。

【0092】較佳地，該溶析緩衝液之疏水性隨著疏水劑如乙二醇或丙二醇而增加。在一實施例中，該溶析緩衝液中疏水劑比例之範圍由 20%至 70%、由 30%至 50%，或較佳者為由 40%至 50%。

【0093】該溶析緩衝液尤佳之離子強度及疏水性，在 pH 值由 7 至 8 之緩衝液中一起增加。在一實施例中，該溶析緩衝液中疏水劑比例之範圍由 20%至 60%，且其離子強度之範圍由 0.5 至 2.0 M。較佳地，該疏水劑比例之範圍由 30%至 50%，且離子強度之範圍由 1.0 至 1.8 M，或是該疏水劑比例之範圍由 40%至 50%，且離子強度之範圍由 1.2 至 1.6 M。

【0094】在一較佳之實施例中，活化且穩定之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 分子之脫附作用，係透過使用一包含 45%丙二醇、1.5 M 氯化鈉，pH 值為 7.5 之 Tris 緩衝液而進行。

【0095】該溶析步驟通常在每小時 10 至 72 管柱容積 (CV)，較佳者為 18 至 54 CV/小時之流率下進行。在某些實施例中，該溶析流率之範圍由 30 至 48 CV/小時，較佳者為 36 CV/小時。當流率增加時，該潛在的與自由態之固定配體的重新連結作用減少了，並且從溶析餾分中回收的 TgFVII 增加了。此效應主要係有關於該配體對 TgFVII 或 TgFVIIa 之強親和力。

【0096】在進行本發明所提出之親和性純化後，製備出純度超過 90%之 TgFVII/ TgFVIIa，兔乳蛋白(RMP)之表現減少了超過 4 個十進制對數(減少了 $4 \log_{10}$ 或 99.99%)。儘管如此，RMP 通常低於 500000 ppm，較佳者為低於 100000 ppm，且尤佳者為低於 50000 ppm。兔之運鐵蛋白被證實為最重要的隨附污染性 RMP 之一。

【0097】為了將 RMP 減少至一極低之水平，通常低於 5 ppm，該純化方案必須整合許多正交之方法。「正交之方法」係指多步驟純化程序採用數種不同於彼此之分離機制。在本發明中，純化步驟係以層析法做為基礎，因為其具有選擇性、有效率，並且易於擴大規模。該些方法之結合經過專門設計，以確保最終產生之 TgFVII 及/或 TgFVIIa 有高質量、無聚結體，且僅有極低水平之降解態或氧化態。

【0098】此外，申請人發現該親和性層析具有意外且令人驚喜的特性，特別是其增強之減少病毒滴定量的能力，該些病毒中，包膜病毒有例如小鼠白血病毒(Murine Leukaemia Virus, MLV)，以及非包膜病毒有例如豬細小病毒(Porcine ParvoVirus, PPV)。

【0099】在一尤佳之方式中，進行該親和性層析步驟以得到一高於 $3 \log_{10}$ 之病毒折減因數(reduction factor, RF)，較佳者為高於 $4 \log_{10}$ ，更佳者為高於 $5 \log_{10}$ 。

【0100】「病毒折減因數」係指，進行層析步驟前所測得之病毒數量(滴定量 x 體積)(即初始載量的病毒滴定量之值)，以及，進行層析步驟後所測得之病毒數量(滴定量 x 體積)(即溶

析液中病毒滴定量之值)，兩者之比值。該病毒滴定量係套用 Spearman Kärber 公式進行計算，該公式在 Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, 6th Edition 中，於 Federal Gazette N° 84, May 4 1994, 中以及於 Schmidt, N.J. & Emmons, R.W. (1989)中有所描述。

【0101】 超過濾/透析過濾

【0102】 根據本發明，在進行更進一步純化之前，可以藉由透析過濾或稀釋該親和性純化材料，以減少該離子強度。在本發明之一實施例中，使用一超過濾膜，其截斷範圍由 5 至 50kDa，較佳者為 10 至 30kDa。藉由緩衝液交換，該含有鈉鹽(本發明之一實施例中為檸檬酸三鈉鹽)之緩衝液的離子強度，減少至範圍由 1 至 50 mM，較佳者為 5 至 15 mM。

【0103】 在本發明之一實施例中，在此步驟中可進行有利地長期儲存，且較佳者為儲存於-20°C 以下之低溫。

【0104】 在本發明之一實施例中，該透過減少鹽分、長期儲存以及移除微生物而穩定之親和性純化材料，可以更進一步地進行純化。

【0105】 離子交換層析

【0106】 根據本發明一較佳之實施例，本發明之該過程更包含至少一個離子交換層析步驟，以更進一步純化 TgFVII 及 TgFVIIa。

【0107】 較佳地，至少在陰離子交換樹脂上進行一個層析步驟。可透過一強鹼或弱鹼型層析載體來進行前述之陰離子交換層析。在某些實施例中，可使用來自不同商業用樹脂之四級

銨官能基(quaternary ammonium functionalized group)，像是 GE Healthcare 生產之 Q-Sepharose，尤佳者為 Q Sepharose XL 型。該清單無限制性，且可使用由 Bio-Rad、Pall Biosepra、Merck、Millipore 或其他供應商生產之強陰離子交換器。

【0108】有利地，在該陰離子交換器上進行之分離步驟中，TgFVII 活化成爲 TgFVIIa 之現象有所增加。

【0109】裝載步驟

【0110】該預純化之材料吸附到陰離子載體上，首先平衡至相同傳導度及相同鹽度之範圍內。

【0111】在本發明之一實施例中，於裝載步驟之後隨即改變鹽類，以加強該 RMP 與陰價離子間的相互作用。該鈉鹽，尤其是檸檬酸三鈉鹽，被換成傳導度較低之咪唑緩衝液。在此特別之緩衝液中，咪唑之範圍由 1 至 50 mM，較佳者爲由 5 至 30 mM，更佳者爲 20 mM。該緩衝液之 pH 值亦維持在由 6.5 至 8.5 之範圍內，較佳者爲由 7 至 8。在此情況下，運鐵蛋白以及非活化態之 TgFVII 或與其他蛋白複合之 TgFVII，顯現一增強之與陰離子交換樹脂間的相互作用。

【0112】第一洗滌步驟

【0113】在本發明之一實施例中，第一洗滌步驟之應用，係透過增加鹽分濃度，尤其是氯化鈉鹽之濃度，至介於 50 至 175 mM 之範圍內，更佳者爲介於 130 至 160 mM 之間。可透過梯度或階級效應來應用此洗滌步驟。在本發明之一實施例中，此洗滌步驟對乳汁內源性產生之運鐵蛋白展現專一性溶析作用，與此同時，在有咪唑緩衝液存在之情況下，

TgFVII/TgFVIIa 停留在該離子凝膠上，且與其他蛋白複合之 TgFVII 的痕量亦維持吸附狀態。

【0114】 TgFVII/ TgFVIIa 之溶析作用

【0115】 在本發明之實施例中，藉由降低鹽分，尤其是氯化鈉鹽，之濃度至介於 0 至 75 mM 之範圍內，更佳者為介於 40 至 60 mM，同時藉由引入極低濃度之鈣鹽，其介於 2 至 9 mM 之範圍內，更佳者為介於 5 至 8 mM，而自該陰離子交換器溶析出 TgFVII/TgFVIIa。鈣與含 gla-域之蛋白(FVII 分子)間之特定的相互作用，已歷經長期的研究。FVII 分子之構型變化導致一全域電荷變化，允許在低傳導度下進行溶析作用。在本發明之一實施例中，在咪唑存在之情況下，與其他蛋白複合之 TgFVII 的痕量維持吸附狀態。其他鹽類例如三羥甲基氨基甲烷(tris-hydroxymethyl aminomethane)或檸檬酸三鈉，顯示對於自由態之 TgFVII 及/或與其他蛋白複合之 TgFVII 有共溶析效應。

【0116】 由陰離子交換器溶析出之 TgFVII 包含由 50%至 100%之活化態的 TgFVIIa，更佳者為由 80%至 100%。

【0117】 此外，申請人發現該離子交換層析具有意外且令人驚喜的特性，特別是其增強之減少病毒滴定量的能力，該些病毒中，包膜病毒有例如小鼠白血病毒(MLV)，以及非包膜病毒有例如豬細小病毒(PPV)。

【0118】 在一尤佳之方式中，進行該離子交換層析步驟以得到一高於 $3 \log_{10}$ 之病毒折減因數(RF)，較佳者為高於 $4 \log_{10}$ ，更佳者為高於 $5 \log_{10}$ 。

【0119】 偽親和性層析，較佳者為於羧磷灰石上進行

【0120】 在本發明之一實施例中，該由陰離子交換層析收集而來，且含有 TgFVII 及/或 TgFVIIa 之溶析液，透過偽親和性層析作用，有利地於一羧磷灰石凝膠($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)上，可進行更進一步的純化。

【0121】 此額外之偽親和性層析作用，較佳者為在下列情況下進行：透過水性緩衝液 A 使該管柱達到平衡，該水性緩衝液 A 包含由 10 至 30 mM 之磷酸鉀或磷酸鈉或其混合物，其 pH 值介於 7.5 至 8.5 之間。

【0122】 該些配置了鈣之 TgFVII/ TgFVIIa 之分子，保留在載體上，而 Des-gla-FVII 與其他裂片則隨著流出液而被移除（「Des-gla-FVII」係指一 FVII 之 Gla 域被移除了，可能是透過水解作用移除）。

【0123】 在裝載步驟結束之後隨即對緩衝液 A 進行滲濾，溶析出一部分在過程中局部斷裂之 TgFVII 及/或 TgFVIIa，此情況能夠良好地消除 FVII 之不良型態，例如低活性或無活性之 TgFVIIa。

【0124】 TgFVIIa 之溶析作用，係透過一含有磷酸鹽，例如磷酸鈉或磷酸鉀或其混合物，之緩衝液，在預定之濃度下進行，較佳者為表現一包含由 0.1 M 至 0.5 M 磷酸鈉（較佳者為由 0.1 M 至 0.2 M），且 pH 值介於 7.5 至 8.5 之間的緩衝液 B。該結果之溶析液含有完全活化之 TgFVIIa，且僅有微量比例之斷裂型態。

【0125】 粒徑篩析層析

【0126】 RMP 之最後痕量僅能透過質譜法 (mass spectrometry) 或專一性酵素免疫測定法 (specific ELISA) 進行辨認。在最後的精製化步驟之前，RMP 之範圍介於 50 至 500 ppm 之間，尤佳者為低於或等於 300 ppm。

【0127】 在本發明之一實施例中，可透過粒徑篩析層析來進行更進一步之純化步驟。為了達到最佳之選擇性，粒徑篩析管柱之高度、樹脂孔隙及層析緩衝液必須經過選定。相當於 Superdex S75 prep grade，更佳者為 Superdex S200 prep grade，之高性能樹脂，對於精製化步驟而言是不可或缺的。高度大於 60 cm 且低於 120 cm，更佳者為大於 80 cm 且低於 110 cm，之凝膠床，具有足夠之分辨率，能夠移除 2 個額外的 logs(對數) 之 RMP 痕量。

【0128】 在一實施例中，在 SEC(粒徑篩析層析)步驟期間應用之緩衝液交換，含有一非離子型清潔劑，其濃度介於 20 至 500 ppm 之間，或較佳者為介於 50 至 200 ppm，無限制地與胺基酸(例如精胺酸(arginine)或甘胺酸(glycine))或糖組合使用。緩衝液中存在離子型清潔劑，有利於幫助維持 SEC 步驟中 TgFVII/ TgFVIIa 之單體狀態，使 FVII 及汙染分子能夠呈最佳之分離狀態。在本發明之一實施例中，該配製用緩衝液含有不同種氨基酸與去水山梨醇單月桂酸酯(sorbitan monolaurate)及/或去水山梨醇單油酸酯(sorbitan monooleate)之混合物，如同 US Patent 2012/0087908 中所述。組合使用一介於 10 至 40 cm/hr，更佳者為介於 20 至 25 cm/hr，之線性流率以及一裝載容量範圍由 1%至 10%，更佳者為由 2%至 5%，之 SEC 管柱容

積，以獲得一單尖峰之 TgFVII 及/或 TgFVIIa，且 RMP 低於 5 ppm，或純度高於 99.9995%。

【0129】此外，申請人發現該粒徑篩析層析具有意外且令人驚喜的特性，特別是其增強之減少病毒滴定量的能力，該些病毒中，包膜病毒有例如小鼠白血病毒(MLV)，以及非包膜病毒有例如豬細小病毒(PPV)。

【0130】在一尤佳之方式中，進行該粒徑篩析層析步驟以得到一高於 $3 \log_{10}$ 之病毒折減因數(RF)，較佳者為高於 $4 \log_{10}$ ，更佳者為高於 $5 \log_{10}$ 。

【0131】因此，該親和性層析步驟及/或離子交換層析步驟及/或粒徑篩析層析步驟，能夠得到一高於 $3 \log_{10}$ 之病毒折減因數(RF)，較佳者為高於 $4 \log_{10}$ ，更佳者為高於 $5 \log_{10}$ 。

【0132】病毒之消除/去活化

【0133】本發明之該方法亦能包含至少一個專用於病毒去活化/移除之步驟，但尤佳者為必須包含至少兩個正交之專用於病毒去活化/移除之步驟。該澄清之乳汁能藉由化學處理，如溶劑及/或清潔劑處理或其他種類之有效處理等，將病毒去活化。在本發明之一實施例中，使用了溶劑/清潔劑處理，尤其是一 Tween® 80 (1% to 1.5% w/v)以及 TnBP (tri-n-butyl phosphate 0.3% to 0.5% v/v)之混合物，以將病毒去活化。其他非離子型清潔劑例如 Octoxynol100 或 Triton X114 或 Sodium Cholate 或 Tween® 20 等，無所限制，亦可取代或輔助 Tween® 80。

【0134】此外，該由任何前述之層析步驟產生之溶析液，

能被呈遞給一超微過濾步驟，以有效地消除病毒，尤其是該些非包膜病毒，例如細小病毒 B19。特別是使用過濾器 ASAHI PLANOVA™15，能夠擋住該些體積大於 15 nm 之病毒。

【0135】在本發明之一實施例中，較佳為在第一次層析步驟後進行超微過濾，其中 TgFVII 之純度超過 90%，且移除了足夠的高分子大小蛋白(例如酪蛋白微團)之主要部分，使其能以超微過濾器的孔徑進行過濾。一開始之 FVII 濃度較佳者為介於 1.0 至 2.5 g/L 之間，更佳者為介於 1.3 至 2.2 g/L 之間，且通常之流率為介於 5 至 15 LMH 之間，較佳者為介於 8 至 12 LMH 之間(「LMH」係指每小時每平方米之公升數，或 L/m²/h)。

【0136】除了移除病毒，超微過濾器亦能藉由其孔徑寬度的篩分機制，有利地減少內源性 DNA。

【0137】在本發明之一實施例中，可使用奈米平均孔徑相當於 Planova15 之超微過濾器。20 奈米孔徑之過濾器可以取代 15 奈米過濾器，且該 15 奈米過濾器可以耦合使用以進行更高孔隙度之過濾。在本發明之一實施例中，依照 0.2μm/0.1μm、Planova 20 超微過濾器、Planova 15 超微過濾器之順序，可有利地在同時間內減少任何風險(初始污染菌、黴漿菌、病毒、不定劑、TSE)，而不會失去 TgFVII/ TgFVIIa 之生物活性。

【0138】配製、滅菌、冷凍乾燥

【0139】一旦回收了最後的含有純化之 TgFVII 及 TgFVIIa 之溶析液，前述之溶析液可呈遞給使用 0.22μm 過濾器之過濾步驟，填充至容器中並且進行冷凍/乾燥。

【0140】較佳地，本發明中有利地使用改造之 PVDF 膜，

因爲如同 furnishers 所描述，其對蛋白爲低結合力，對非離子型清潔劑爲低吸附力。Millipore 生產之 Durapore®膜過濾器能良好地適應於此步驟，但並無限制使用其他商業用過濾器。

【0141】 下列實例係在不限定本發明範疇之情況下闡釋本發明。

【0142】 實例

【0143】 實例 1：專一性抗 - FVII/ FVIIa 配體之製備

以高純度之人類 FVIIa 抗原接種駱馬。在次級免疫反應之後，觀察到滴定量增加超過 100 倍，表示豐富的抗-人類 FVIIa/FVII 之抗原。收集該駱馬的 RNA，形成 VHH 表現基因庫。複製體以 ELISA(酵素免疫測定)測定具有與人類 FVIIa 結合能力之駱馬 VHH 的表現量。選定 23 個 VHH 複製體並且進一步測試其與血漿產生之人類 FVII 及 FVIIA 以及重組之兔 FVII 結合的能力。結果爲所有的複製體皆能夠與人類 FVII 及 FVIIA 結合，且無觀察到與重組之兔 FVII 交叉結合的現象。接著更進一步地測試這些複製體對 FVII/FVIIA 結合及溶析的能力，以及在酸性 pH 值環境中其結合特性之穩定性。被選定之候選複製體被重新複製到 BAC 酵母表現系統，表現出相對應之配體，其後再以每 ml 基質 2.5 mg 之配體密度耦合至 NHS-Sepharose 中。

【0144】 實例 2：自乳汁中純化 TgFVIIa

本實例描述由 150 公升兔乳高度純化而來之活化的 TgFVII 溶液之製備。

【0145】 2.1 收集乳汁

【0146】該乳汁之複合起始池係由連續六天收集乳汁之完整的泌乳周期之小型池所構成，填充至 1L 容積瓶中，取樣進行生物性安全控管(初始污染菌、內毒素及內源性病毒)，之後於極低溫($<-60^{\circ}\text{C}$)之環境中冷凍，進行長期儲存($<-20^{\circ}\text{C}$ 儲存數月)。第 4 天至第 24 天收集之乳汁相對應於產乳之天然循環。

【0147】 2.2 澄清作用

【0148】含有乳汁之冷凍瓶被置於一溫度維持在 $32-37^{\circ}\text{C}$ 之巨大解凍槽中。解凍時間大約為 1 小時，以取得每瓶中之最後一塊冰。將 147.4 kg 解凍之源材料(Source Material, SM)轉移匯入一 500 L 之混和系統包。加入 0.315 M 之檸檬酸三鈉緩衝液以得到範圍由 20 g/L 至 40 g/L 的蛋白濃度。調整該混合物之溫度至 $24-26^{\circ}\text{C}$ 。停止該混和系統以令脂肪能夠傾析於稀釋且含檸檬酸之 SM 的上層。

【0149】孔徑大小之範圍介於 15 至 $0.5\mu\text{m}$ (PDH4)以及介於 0.3 至 $0.1\mu\text{m}$ (PEKS)之深度過濾，係由 STAX 設備(Pall Corporation 製)進行，在緩衝液中被初步平衡。對以檸檬酸緩衝液處理之乳汁進行過濾，並且在透過 $0.45/0.2\mu\text{m}$ Sartobran® 過濾器(Sartorius Corporation 製)進行 $0.2\mu\text{m}$ 孔徑過濾之前，有 444 Kg 的濾液被填充進一個一次性使用包。不同過濾器的過濾能力，根據其漸進平均孔徑，可適用於不受大約每平方米 2 至 15 kg 的蛋白造成阻塞之過濾。

【0150】 2.3 S/D 處理

【0151】將聚山梨醇酯 80(Polysorbate 80)及磷酸三正丁酯(Tri-n-Butyl Phosphate)之溶液添加進澄清之源材料(clarified

source of material, CSM), 以得到 509.8 Kg 之含有 0.8-1.5% w/v 清潔劑及 0.2-0.5% v/v 溶劑的溶液。在此情況下，將溫度調整至 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，且至少經過兩小時的接觸時間，以維持該生物性來源中任何潛在的非包膜病毒呈去活化狀態。殘留之來自乳汁的脂質或三酸甘油脂的痕量，亦透過添加清潔劑與溶劑而被化學溶解，令溶液更適合於進行進一步之層析步驟。

【0152】 2.4 專一於基因轉殖 FVII/ FVIIa 之配體的親和性層析

【0153】 以 pH 值 7.5、50 mM 之緩衝液平衡該管柱，接著裝載該含有該蛋白之溶液至 220 L/H。6 公升之親和性凝膠足以吸附已處理乳汁池中所有的 TgFVII。裝載步驟之後，使用 Tris 緩衝液進行第一次洗滌步驟。需要 90 公升之緩衝液以確保穩定的基線回歸。藉由此洗滌步驟除去透過非專一性相互作用而結合之蛋白。

【0154】 爲了使 RMP 之溶析量最大化並使 FVII 之脫附量最小化，執行一最佳洗滌步驟，該步驟係增加初始緩衝液之氯化鈉離子強度至 500 mM，以及透過 30% v/v 之丙二醇增加相對疏水性。

【0155】 爲了使 RMP 之脫附量最小化並使 FVII 之溶析量最大化，執行一最佳溶析步驟，該步驟係增加氯化鈉離子強度至 1500 mM，以及透過 45% v/v 之丙二醇增加相對疏水性。

【0156】 自親和性溶析分餾收集了 50.6 公升之溶析液。該親和性溶析液之醯氨水解之 FVII/抗原性 FVII 比率，接近於 1(1 單位之凝血因子對 1 單位之抗原分子)。該親和性步驟能夠移

除 RMP 之主要部分達 4 log 清除量。

【0157】藉由此方法，成功地免疫純化了可凝結之 TgFVII/TgFVIIa。

【0158】 2.5 超過濾

【0159】做爲一替代方案，可被儲存之中間產物被製造來使用於超過濾技術。該親和性 S/D 處理之溶析液被濃縮且被穩定在 30kDa 聚醚砜膜 (Polyethersulfone membrane) (Novasep 生產之單次使用式 TangenX Sius-LS®) 之上。濃縮期間藉由調整循環泵之轉速，將透膜壓力維持在 20 psig。當得到蛋白濃度爲 2 g/L 時，在檸檬酸緩衝液中進行透析過濾，以移除親水性之化合物、鹽類及化學溶劑。

【0160】 2.6 無菌過濾及冷凍-中間產物 1

【0161】 10.4 L 之具有專一性活性、2638 mg 之濃縮中間產物，在一層流通風櫥中，透過 Sartobran® 0.45/0.2 μm 膠囊進行無菌過濾，並過濾至 1L 容積之容器中。

【0162】瓶子被儲存在 <-60°C 之環境中，以構成供下游過程使用之中間產物。

【0163】 2.7 0.2/0.1 μm 過濾及在 20N 與 15N Planova 過濾器中進行超微過濾

【0164】將 TgFVII/TgFVIIa 產物使用於人類的臨床與製藥，更進一步的純化作用是必要的。首先，爲了減少潛在的病毒載量，該中間產物透過下列過濾系列進行過濾：

- Sartorius 生產之 0.2/0.1 μm Sartopore 2® 拋棄式膠囊
- ASAHI KASEI 生產之 1 sq.m Planova® 20，隨後是 1 sq.m

Planova® 15

【0165】 9.45 L 的中間產物在 12 LMH 初始流率下，被直接加壓通過該過濾系列，並且在整個步驟期間監控透膜壓力，使其在每個超微過濾器中維持最大值 12psig。在本過程之此步驟中，純度計算為大約 95%，並且將內源性產生之運鐵蛋白識別為一種主要的污染物。

【0166】 在本過程之此階段中，在還原的狀態下，藉由 SDS-PAGE 分析量化，評估出 TgFVII 之活化(程度)介於 20%至 50%之間。部分活化係歸因於在純化過程之澄清作用期間自乳汁中釋出的鈣。

【0167】 2.8 於 Q Sepharose XL 上之離子交換層析

【0168】 TgFVII 之純度與活性，透過陰離子交換層析以及鈣依賴型溶析而增強。經過超微過濾處理之溶液先與 10 mM、pH 值 7.0 之檸檬酸鈉達到平衡，而後被裝載至 Q Sepharose XL 陰離子交換器(GE Healthcare 製)。

【0169】 使用 pH 值 7.5、20 mM 之咪唑，且其傳導度在 25 °C 時低於 5 mS/cm，以進行第一洗滌步驟。第二洗滌步驟則使用 150 mM 之氯化鈉加上 20 mM 之咪唑，以令傳導度在 25°C 時達到 18 mS/cm。該洗滌尖峰被識別為主要由自由態之運鐵蛋白組成。接著藉由減少氯化鈉鹽至 50 mM 同時增加氯化鈣至 7 mM，以溶析出 TgFVII/TgFVIIa，且過程中將咪唑維持在 20mM。在還原的狀態下藉由 SDS-PAGE 評估出該溶析分餾含有超過 90%之活化態 TgFVIIa。透過 ELISA 測量 RMP 之水平，並與 TgFVII 相比，計算出殘餘之 RMP 量低於 500ppm(見表 3)。

【0170】 QSXL 層析造成 HRI 之水平降低，平均數為 $2 \log_{10}$ ，其中有 $1.6 \log_{10}$ 係運鐵蛋白。

【0171】 在此步驟中，存在於溶析緩衝液中的鈣離子增強了活化成爲 FVIIa 之活化作用。接著將 Q-Sepharose XL 溶析液在 $+2/+8^{\circ}\text{C}$ 之溫度下儲存過夜。

【0172】 2.9 於羥磷灰石上之偽親和性層析

【0173】 在儲存期間，可能會有一些 FVII 產生裂解，尤其是重鏈之裂解，而輕鏈受到鈣離子的保護。已清楚知曉，羥磷灰石及磷酸鈣之吸附劑會吸附凝血因子例如 FVII/FVIIa 以及更廣泛的含 Gla-域之蛋白。此偽親和性係使用於本過程中之精製化步驟。

【0174】 含有 FVII/ FVIIa 之 Q Sepharose XL 溶析液，在 CHT 陶瓷製羥磷灰石第一型管柱 (Ceramic hydroxyapatite Type I column) (BioRad 製) 中被濃縮，濃縮之前該溶液以 25 mM、pH 值 8.0 之磷酸鉀達到平衡。

【0175】 透過 25 mM、pH 值 8.0 之磷酸鉀進行等度洗滌步驟。此洗滌步驟專門溶析出水解型態，尤其是在其重鏈上含有一或多個裂解之 TgFVII/TgFVIIa，且此步驟受到監控，以限制在一等度模式中完全活化態之最小損失量。

【0176】 接著，TgFVII/TgFVIIa 透過 150 mM、pH 值 8.0 之磷酸鉀，被溶析成爲濃縮的 TgFVIIa。

【0177】 2.10 於 Superdex 200 上之粒徑篩析層析 (SEC)

【0178】 單體態 TgFVII/TgFVIIa 之穩定作用，係由該過程中最後之精製化步驟完成。SEC 能夠移除磷酸鉀並至少配製成

為聚山梨醇酯 80 及精胺酸。

【0179】該由羥磷灰石層析管柱溶析出、含有 TgFVII/TgFVIIa 之餾分，被裝載到 Superdex 200 管柱(GE Healthcare 製)上，裝載之前該餾分與 pH 值為 6.0 之 5 mM 檸檬酸鈉、114 mM 精胺酸鹽酸、46 mM 異白胺酸、16 mM 甘胺酸、6.5 mM 離胺酸，以及 0.07% (v/v) Tween 80 達到平衡。

【0180】具有較高動態半徑或較大分子尺寸之蛋白，例如運鐵蛋白(70kDa)或與其他蛋白複合之 FVII，在該單體態之 TgFVIIa(45 kDa)進行粒徑篩析之前，進行溶析。

【0181】具有較低動態半徑或較小分子尺寸之蛋白，例如酪蛋白或肽，在該單體態之 TgFVIIa(45kDa)之後進行溶析。

【0182】該含有 TgFVII/TgFVIIa 之餾分，係透過與平衡管柱所用相同之緩衝液來進行溶析。

【0183】 2.11 穩定與配置

【0184】最後的 TgFVII/TgFVIIa 溶液，在濃度為 1g TgFVIIa/L 之含有 5 mM 檸檬酸鈉、114 mM 精胺酸鹽酸、46 mM 異白胺酸、16 mM 甘胺酸、6.5 mM 離胺酸，以及 0.07% (v/v) Tween 80，pH 值為 6.0 之配製用緩衝液中進行配製。

【0185】在還原的狀態下，藉由 SDS-PAGE 評估出 93.5% 之活化態的 TgFVIIa。

【0186】 2.12 滅菌

【0187】接著，5243 mL 之配製之穩定的 TgFVII/TgFVIIa 溶液，於一 0.2 μ m Millipak 100 膜中進行無菌過濾。

【0188】實例 3：過程中結果分析

對純化過程中產生之樣本，如實例 2 中所述，進行分析。

【0189】 3.1 純化過程再現性

【0190】 將每個步驟中產生之 FVII 分成 8 個批次，進行 FVII 醯胺水解測定或吸光度測定，結果統整於表 1 及表 2。

表 1：截至超微過濾產生之醯胺水解 FVII

	澄清作用	S/D 處理	親和性	超過濾及透析過濾
Batch 1	98%	136%	56%	75%
Batch 2	101%	116%	51%	89%
Batch 3	95%	120%	54%	91%
Batch 4	109%	85%	N/D	N/D
Batch 5	91%	106%	55%	99%
Batch 6	107%	99%	48%	99%
Batch 7	N/D	83%	47%	86%
Batch 8	104%	94%	48%	93%
平均值	100%	110%	53%	91%
SD	7%	18%	3%	10%

N/D: 無數據日期

表 2：截至滅菌過濾產生之 FVII 吸光度

% Step	超微過濾	QSXL 層析	CHT-I 層析	SEC 層析
Batch 1	88%	61%	75%	92%
Batch 2	95%	59%	60%	89%
Batch 3	95%	63%	52%	92%
Batch 4	93%	55%	58%	81%
Batch 5	91%	51%	67%	94%
Batch 6	95%	51%	67%	91%
Batch 7	92%	49%	49%	86%
Batch 8	91%	52%	64%	95%
平均值	92%	55%	61%	90%
SD	3%	5%	9%	5%

【0191】 FVII 之產量在每個步驟中顯示一致的結果，以平均值為基準，變異均低於 10%。

【0192】 3.2 RMP 之清除量

【0193】 測定該些測試批次之 RMP 清除量之平均值，結果

顯示於第 2 圖(RMP clearance)。

【0194】在純化過程中 RMP 之清除量可完美地再現。對 RMP 清除量貢獻最多之步驟為：

- 專一於 FVII/ FVIIa 配體上之親和性層析
- Q Sepharose XL 層析，以及
- Superdex200 層析

表 3：該純化過程中 RMP 之清除量

3 批次之平均值	澄清乳汁	親和性層析後	QSXL 層析	SEC 層析
RMP in ppm	417 731 959	52 356	1733	13

【0195】該過程造成之 RMP 清除量整體值介於 $8 \log_{10}$ 至 $9 \log_{10}$ 之間。

【0196】3.3 兔 DNA 之清除量

【0197】透過 Q-PCR 技術檢測該不同過程中間產物之內容物，兔 DNA 之清除量亦受到評估。相對應之結果顯示於第 3 圖(DNA clearance)中。該些結果以 ppb 為單位表示，係有關於透過 ELISA 測得之乳汁中的 TgFVII/TgFVIIa 濃度，以及透過 OD280 測得之其他中間產物。

表 4：該純化過程中兔 DNA 之清除量

	澄清乳汁	親和性層析後	超微過濾	SEC 層析
DNA in ppb	371 134	69 808	<23	<4

【0198】貢獻最多的步驟係超微過濾。在 Q Sepharose XL 層析之後，所有的批次皆低於量化水平(quantification level, LOQ)。

【0199】該過程造成之 DNA 清除量整體值介於 $5 \log_{10}$ 至 $6 \log_{10}$ 之間。

【0200】 3.4 FVII 之活化動力學

【0201】 誠如上文所公開，在該過程中 TgFVII 活化成爲 TgFVIIa，且主要係 Q Sepharose XL 層析增強了活化作用。如下方表 5 中詳細敘述，在該過程結束時，凝血單位比抗原單位之比例所定義之活化比率介於 17 與 25 之間。

表 5：純化過程中之 TgFVIIa 之量化

TgFVII 之活化(平均 3 PB)	Tg FVIIa	活化比率之範圍
超微過濾之前	23,434	4 to 5
超微過濾	16,595	7 to 9
QSLX 溶析	16,032	14 to 17
CHT-I 溶析	160,822	17 to 25
SEC 池	45,855	17 to 25

【0202】 可粗略簡易地對 TgFVII 進行 SDS-PAGE (Coomassie Blue 染色，第 4 圖)

【0203】 透過蛋白質圖譜分析 (Protein Mapping analysis) (RP(C4)-HPLC-MS)，FVII 之異型體亦可被更高度準確地量化。對該些由活化位(重鏈與輕鏈)裂解而產生之具生物活性的 TgFVIIa 進行測定。該些未裂解之鏈對應於該些僅具極低生物活性之非活化態 TgFVII，而由輕與重鏈裂解而產生之異型體則對應於分子降解及生物活性去活化(% LC: Light Chain Cleavage 輕鏈裂解或 % Des-Gla，% HC: Heavy chain Cleavage 重鏈裂解)。

【0204】 該分析方法無法專門用於量化氧化態。非活化態之量化中包含了該些型態。

【0205】 非活化態、非降解之 TgFVII 在該過程中逐漸減少，亦即爲 TgFVII 活化成爲 TgFVIIa 之徵兆。在 3 個測試批

次中，活化作用逐步進行，且在該過程結束時，保留平均 3.6% 之非活化型態。此非活化型態不受降解並且保留其在後續過程(配製操作)中及在靜脈給藥時被活化之可能性。其保留自身在人類血漿中活化之潛力。

【0206】 3.5 過程中 TgFVIIa 之降解

【0207】 在此實例中，該羧磷灰石(CHT)之溶析餾分被濃縮為 3.9 g/L TgFVIIa，並且該 RP-HPLC 之結果總結於表 6，與表 7 之 SEC 結果相比較。

表 6：CHT 溶析液中 FVII 型態之重新分層(RP-HPLC)

輕鏈	28.21%
裂解之輕鏈	1.67%
重鏈	62.29%
裂解之重鏈	6.66%
氧化+ 非活化態鏈	1.10%

表 7：純化產物中 FVII 型態之重新分區(RP-HPLC)

輕鏈	31.37%
裂解之輕鏈	0.48%
重鏈	61.16%
裂解之重鏈	5.82%
氧化+ 非活化態鏈	1.12%

【0208】 在 CHT 溶析液及最終純化產物(SEC 溶析液)兩者中，所有 TgFVII 中，有超過 90% 為既非裂解亦非氧化態之 TgFVII。此結果清楚地顯示 CHT 步驟控制降解 TgFVII 之能力，而非活化 TgFVII 之能力。

【0209】 實例 4：高度純化之 TgFVIIa 之準備劑質量

【0210】 4.1 純化溶液中殘餘 RMP 之量化

【0211】 來自於駱馬抗體、高度專一於 FVII 之配體，與更經典之層析技術(離子交換、羧磷灰石偽親和性，以及粒徑篩

析)結合使用，因此令該由對乳汁中純化 TgFVII/ TgFVIIa 之純化作用能夠最佳化，盡量移除更多特定之 RMP。

【0212】如表 8 中所描述，試行批次(15L 之乳汁)中之 RMP 水平大約為 10 ppm，且低於較低水平量化(LLOQ)，或在大規模(150L 之乳汁)生產之批次中低於 6 ng/ml。

【0213】透過 ELISA 檢測到純化產物中含有運鐵蛋白，而其在試行批次中之含量接近於 3ppm。

表 8：純化產物中之 RMP 及運鐵蛋白汙染物

	RMP ppm	運鐵蛋白 ppm
Pilot batch 1	13	4
Pilot batch 2	< 6	3
Pilot batch 3	< 6	3
Large scale batch 1	< 6	N/A

N/A: 無數據

【0214】 4.2 純化溶液中殘餘兔 DNA 之量化

【0215】如前述之該過程，從而達成使殘餘 DNA 低於 4 ppb 之目標。

【0216】 4.3 兔之第七凝血因子

【0217】因為兔子在其循環系統中具有內源性產生之第七凝血因子，且有一些血清蛋白從血液被動滲漏進乳汁中，因此對該純化過程中分離人類與兔之 FVII 的能力進行評估。為了調查這些潛在之隨附蛋白是否存在於純化產物中，在內部開發了一專門之 ELISA。其結果為低於 LLOQ(分析所有的準備劑，均小於 45 pg/ml)。

【0218】實例 5：在 TgFVIIa 專一性配體上執行親和性層析步驟後，包膜病毒(MLV, Murine Leukemia Virus 小鼠白血病病

毒)之病毒清除量之研究

小鼠白血病毒(Murine Leukemia Virus, MLV)之特性描述於下表：

病毒	MLV
名稱	小鼠白血病毒(Murine Leukemia Virus)
科	逆轉錄病毒(<i>Retroviridae</i>)
亞科/屬	正反轉錄病毒亞科 γ 病毒屬(<i>Orthoretrovirinae Gammaretrovirus</i>)
天然宿主	鼠
基因組	ARN
有無包膜	具包膜
直徑大小	80-110 nm

【0219】 5.1 感染力滴定檢測

【0220】 5.1.1 感染力滴定之原則

【0221】 該滴定法係一種定量檢測，其病毒滴定量之測定之基礎，係透過觀察一種特定之細胞病變效應，以偵測受感染細胞內的病毒產量。

【0222】 該滴定檢測會在下列所述之兩種不同的 96 孔細胞培養盤上完成：

- 對整個 96 孔細胞培養盤進行一系列 3 倍稀釋(每次稀釋重覆 8 次)，以稀釋測試樣本與培養基(「樣本稀釋盤」)。
- 接著，「樣本稀釋培養盤」之每一個孔，均接種至一個新的 96 孔細胞培養盤之相對應的孔上(「樣本滴定盤」)。

【0223】 將細胞懸浮液加入「樣本滴定盤」之每一個孔，並且將該些培養盤置於溫度適當、具有或不具有二氧化碳(依據病毒種類)之環境中培養。

【0224】 經過一段時間的培養之後，病毒能夠複製並且感

染相鄰細胞，依據病毒種類而有所不同，

- 透過倒置顯微鏡觀察，並計算被感染之具有病毒疫源的孔。

- 或使用染色覆蓋(結晶紫 1p-半乳糖苷酵素)，並檢查該些孔之細胞病變效應。染色結果為該些受感染之孔呈現為透明區域，而未受感染之孔則呈現為染色狀態(或依據病毒種類而採用其他方法)。

【0225】 透過適當之公式，計算出該感染性滴定量之每毫升之半數組織培養感染劑量(TCID₅₀/mL)。

【0226】 5.1.2 滴定控制

【0227】 *負控制

在每一個滴定檢測中，將細胞製備為細胞基準控制組。這些細胞之製備之條件，相同於該些用於滴定之初步檢測過程中產生的樣本，差別在於該些細胞接種至未添加病毒之培養基(每個 96 孔細胞培養盤中 4-8 孔)。

【0228】 *正滴定控制(病毒基準控制組)

在每一個滴定檢測中，大約 10³ - 10⁵ TCID₅₀/mL 之病毒基準控制組進行滴定之條件，相同於該些用於滴定之初步檢測過程中產生的樣本。

【0229】 5.1.3 滴定檢測之驗收準則

【0230】 該滴定檢測在下列情況時進行保留及驗證：

- 細胞基準控制組之每個滴定盤之結果符合預期，
- 病毒基準控制組得到之感染性滴定量落在符合預期之範圍內。

【0231】 5.1.4 病毒滴定量之測定

【0232】 病毒滴定量之測定係根據 Schwartz D., 1993 (Schwartz D., “Méthodes statistiques à l’usage des médecins et des biologistes”, Flammarion Médecine-Sciences, fourth edition, 1993); Kaplan M.及 Koprowski H., “Laboratory techniques in rabies, third edition, edited by World Health Organization, Geneva, 1973。

【0233】 TCID₅₀ (50%組織培養感染劑量)係使用 Spearman Karber 公式來進行計算。透過定量測量對 TCID₅₀ 進行評估，並且定義為能夠感染 50%之接種培養物的病毒劑量。

【0234】 5.2 實驗協議

【0235】 該過程中所實施之該些步驟為下列所述者：

- 解凍該澄清之源材料；
- 以 1%之包膜病毒 MLV 感染該解凍之澄清源材料；
- 以 0.2 μm 過濾器進行預濾；
- 裝載至 FVII-篩選管柱；
- 洗滌管柱；
- 進行溶析。

【0236】 表 9 提供親和性 FVII-篩選層析步驟中實施之過程情況。

表 9：

操作參數	全尺度條件	病毒清除條件
管柱特性		
管柱形式	徑向	徑向
凝膠(樹脂)基準	親和性篩選 VII*	親和性篩選 VII*
層析參數		
裝載容量	846 L (56.4 L/L 之凝膠)	0.282 L (56.4 L/L 之凝膠)
蛋白載量	≈ 39.6 g (≈ 5.1 g/L 之凝膠)	≈ 5.1 g/L 之凝膠
層析流率	480 L/h	0.16 L/h

*親和性篩選 VII 凝膠相同於實例 2.4 中所使用之親和性凝膠

【0237】 5.3 實驗結果

【0238】 在預濾之步驟後，測量解凍與澄清之源材料樣本(樣本名為 Load 2)之病毒清除量，以及在親和性 FVII-篩選層析之溶析作用後，測量樣本(樣本名為 Eluate)之病毒清除量。結果顯示於表 10。

表 10：在親和性 FVII-篩選層析之前(Load 2)與之後(Elute)測量之病毒清除量

病毒	Load 2			Eluate			折減因數 (log ₁₀)
	滴定量 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	容量 (ml)	總輸入量 (log ₁₀ TCID ₅₀)	滴定量 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	容量 (ml)	總輸出量 (log ₁₀ TCID ₅₀)	
MLV	5.48	282	7.93	<1.84	52	<3.56	>4.37

TCID₅₀：50%組織培養感染劑量

【0239】 表 10 之結果顯示該親和性 FVII-篩選層析步驟減少折減因數之病毒滴定量，減少量高於 4.37 log₁₀。

【0240】 實例 6：在 TgFVIIa 專一性配體上執行親和性層析步驟後，非包膜病毒(PPV, Porcine ParvoVirus 豬細小病毒)之病毒清除量之研究

豬細小病毒(Porcine ParvoVirus, PPV)之特性描述於下表：

病毒	PPV
品系	NADL-2 品系
名稱	豬細小病毒(Porcine ParvoVirus)
科	細小病毒科(<i>Parvoviridae</i>)
亞科/屬	細小病毒亞科/細小病毒屬(<i>Parvovirinae/Parvovirus</i>)
天然宿主	豬
基因組	單股 DNA
有無包膜	無包膜
直徑大小	18-24 nm

【0241】 6.1 實驗協議

【0242】 該過程中所實施之該些步驟為下列所述者：

- 解凍該澄清之源材料；
- 以 1%之非包膜病毒 PPV 感染該解凍之澄清源材料；
- 以 0.65/0.45 μm 及 0.45/0.2 μm 之過濾器進行預濾；
- 施與溶劑/清潔劑處理(1 小時)
- 裝載至 FVII-篩選管柱；
- 洗滌管柱；
- 進行溶析。

【0243】 表 11 提供親和性 FVII-篩選層析步驟中實施之過程情況。

操作參數	全尺度條件	病毒清除條件
管柱特性		
管柱形式	徑向	徑向
凝膠(樹脂)基準	親和性篩選 VII*	親和性篩選 VII*
層析參數		
裝載容量	$\approx 918 \text{ L}$ ($\approx 61 \text{ L/L}$ 之凝膠)	0.31 L (62 L/L 之凝膠)
蛋白載量	$\approx 5.3 \text{ g/L}$ 之凝膠	$\approx 5.3 \text{ g/L}$ 之凝膠
層析流率	480 L/h	0.16 L/h

*親和性篩選 VII 凝膠相同於實例 2.4 中所使用之親和性凝膠

【0244】 6.2 實驗結果

【0245】 在預濾及溶劑/清潔劑處理之步驟後，測量解凍與澄清之源材料樣本(樣本名爲 Initial Load)之病毒清除量，以及在親和性 FVII-篩選層析之溶析作用後，測量樣本(樣本名爲 Eluate A)之病毒清除量。結果顯示於下方第 5 圖之直方圖中。

【0246】 第 5 圖之直方圖顯示該親和性 FVII-篩選層析步驟減少折減因數之病毒滴定量，減少量高於 $3.8 \log_{10}$ 。

【0247】 實例 7：在 Superdex S200 prep grad 上執行粒徑篩析層析步驟後，包膜病毒(MLV)及非包膜病毒(PPV)之病毒清除量之研究

【0248】 7.1 實驗協議

【0249】 該過程中所實施之該些步驟爲下列所述者：該過程中所實施之該些步驟爲下列所述者：

- 解凍該來自臨床批次之起始材料樣本(陶瓷經磷灰石-1(CHT-1)溶析液)；
- 以 1%之病毒(1% MLV 或 1% of PPV)感染該起始材料；
- 以 $0.2 \mu\text{m}$ 過濾器(MLV 用)或 $0.1 \mu\text{m}$ 過濾器(PPV 用)進行預濾；
- 裝載 2.3%管柱容積(CV)至 S200 管柱；
- 收集 S200 之溶析液(對應於 FVII 之餾分)。

【0250】 表 12 提供粒徑篩析層析 Superdex S200 prep grad 步驟中實施之過程情況。

107年1月(5日修(改)止替換頁

操作參數	全尺度條件 1X	全尺度條件 4X	病毒清除條件
管柱特性			
管柱形式	BPG300	Axichrom450	Valichrom 11 - Atoll
凝膠(樹脂)基準	Superdex S200*	Superdex S200*	Superdex S200*
層析參數			
裝載容量	2.3% CV (1.57 L(平均), [1.47 – 1.65])	2.3% CV (3.5 L)	2.3% CV (2.3 mL)
層析流率	16 L/h	36 L/h	0.16 L/h

** Superdex S200 凝膠相同於實例 2.10 中所使用之凝膠

【0251】 7.2 實驗結果

【0252】 在以 0.2 μm 過濾器 (MLV 病毒用) 或 0.1 μm 過濾器 (PPV 病毒用) 進行預濾步驟後，測量 CHT-1 溶析液之樣本 (樣本名為 Load 2) 之病毒清除量，以及在粒徑篩析層析 Superdex S200 之溶析作用後，測量樣本 (樣本名為 Eluate) 之病毒清除量。結果顯示於表 13。

表 13：在粒徑篩析層析 Superdex S200 之前 (Load 2) 與之後 (Elute) 測量之病毒清除量

病毒	Load 2			Eluate			折減因數 (\log_{10})
	滴定量 (\log_{10} TCID ₅₀ /ml)	容積 (ml)	總輸入量 (\log_{10} TCID ₅₀)	滴定量 (\log_{10} TCID ₅₀ /ml)	容積 (ml)	總輸出量 (\log_{10} TCID ₅₀)	
MLV	5.48	2.3	5.84	1.84*	9.80	2.83	3.01
PPV	6.01	2.3	6.37	2.52**	7.17	3.38	3.00

TCID₅₀：50%組織培養感染劑量

【0253】 表 13 之結果顯示該粒徑篩析層析 Superdex S200 減少包膜病毒 (MLV) 之折減因數的病毒滴定量，減少量等於 3.01 \log_{10} ，以及減少非包膜病毒 (PPV) 之折減因數的病毒滴定量，減少量等於 3.00 \log_{10} 。

【0254】 綜上所述：

- 透過該親和性 FVII-篩選層析而得到病毒清除量之高折

減因數，其中包膜病毒(MLV)之折減因數高於 $4.37 \log_{10}$ ，非包膜病毒(PPV)之折減因數等於 $3.8 \log_{10}$ 。

- 透過該粒徑篩析層析 Superdex S200 而得到病毒清除量之中折減因數，其中包膜病毒(MLV)及非包膜病毒(PPV)之縮減因數皆等於 $3.0 \log_{10}$ ；對於減少包膜病毒及非包膜病毒之病毒滴定量，該親和性 FVII-篩選層析比該粒徑篩析層析 Superdex S200 更有效率。

【0255】 實例 8：執行數個技術後之包膜病毒及非包膜病毒的病毒清除量之研究

【0256】 8.1 實驗協議

【0257】 親和性 FVII-篩選層析、超微過濾 以及 Q Sepharose XL 病毒驗證之研究係分開進行，各自在其起始材料中，每純化單位操作加入 1%之各種病毒，並且滴定感興趣之餾分中的病毒(FVII 之餾分已回收)。每純化單位操作得到之 Log_{10} 折減因數，被加入每種病毒中，並且逐一估計每種病毒之全域折減因數。

【0258】 8.2 實驗結果

【0259】 實驗結果列於表 14 中。

104年6月24日修(更)正替換頁

表 14 :

添加病毒	包膜病毒			非包膜病毒	
	MLV	BVDV	PRV	FCV	PPV
模型	反轉錄病毒	包膜病毒中之抗性物種	疱疹病毒、EB 病毒	RHDV、其他中等尺寸非包膜病毒	細小病毒，具抗性之極小非包膜病毒
FVII-篩選層析	> 4.4	NA	NA	NA	3.8
溶劑/清潔劑處理	> 5.2	> 4.5	> 5.9	NE	NE
超微過濾	≥ 4.0	≥ 4.4	NA	≥ 4.6	6.0
溶劑/清潔劑處理+ 超微過濾	≥ 9.2	≥ 8.9	NA	≥ 4.6	6.0
QXL 層析*	≥ 4.9	2.9	≥ 5.1	5.3	6.7
全域折減因數(RF) 估計值	> 18.5	> 11.8	> 11.0	> 9.9	16.5

*相同於實例 2.8 中之離子交換層析步驟

NA: 無數據

NE: 效率不佳。溶劑/清潔劑處理對非包膜病毒效率不佳。

【0260】表 14 顯示：

- 在該過程中，實施 FVII-篩選層析步驟加上超微過濾加上 Q Sepharose XL 離子交換層析步驟，使得病毒減少量增加了 $9.3 \log_{10}$ ，導致非包膜病毒之全域折減因數在 PPV 病毒模型中大於或等於 $18.5 \log_{10}$ 。

- 在該過程中，實施 FVII-篩選層析步驟加上超微過濾加上 Q Sepharose XL 離子交換層析步驟，使得病毒減少量增加了 $10.5 \log_{10}$ ，導致包膜病毒之全域折減因數在 MLV 病毒模型中等於 $16.5 \log_{10}$ 。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 法國分裂與生物技術實驗室
(LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES)

<120> 以基因轉殖合成的第七凝血因子之純化方法

<130> 32511EP LFB

<160> 41

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..22

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 1

Gly Gly Ser Val Gln Thr Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ile
1 5 10 15
Ser Gly Leu Thr Phe Asp
 20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..22

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 2

Gly Gly Ser Val Gln Thr Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
1 5 10 15

Ser Gly Phe Ser Phe Ser
20

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..22
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 3
Gly Gly Ser Glu Gln Gly Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ile
1 5 10 15
Ser Gly Tyr Thr Tyr Gly
20

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..22
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 4
Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val
1 5 10 15
Ser Gly Ala Thr Tyr Ser
20

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE

<222> 1..22

<223> /mol_type="protein"

/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"

/organism="artificial sequences"

<400> 5

Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly

1 5 10 15

Ser Gly Phe Pro Tyr Ser

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..21

<223> /mol_type="protein"

/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"

/organism="artificial sequences"

<400> 6

Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala

1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Ser

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..21

<223> /mol_type="protein"

/note="Antigen-Binding protein Framework 1 domain"

/organism="artificial sequences"

<400> 7

Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ser

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ser Ser

20

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 4 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 8

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 4 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein Framework 4 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

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

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..11
<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein Framework 4 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 11
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ala Ser Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..11
<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein Framework 4 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 12
Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..14
<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<220>

<221> MOD_RES

<222> 12

<223> Xaa can be any naturally occuring amino acid

<400> 13

Ala Leu Gln Pro Gly Gly Tyr Cys Gly Tyr Gly Xaa Cys Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..12

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 14

Val Ser Leu Met Asp Arg Ile Ser Gln His Gly Cys

1 5 10

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..18

<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 15

Val Pro Ala His Leu Gly Pro Gly Ala Ile Leu Asp Leu Lys Lys Tyr

1 5 10 15

Lys Tyr

<210> 16

<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..15
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 16
Phe Cys Tyr Ser Thr Ala Gly Asp Gly Gly Ser Gly Glu Met Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..15
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 17
Glu Leu Ser Gly Gly Ser Cys Glu Leu Pro Leu Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..17
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 18
Asp Trp Lys Tyr Trp Thr Cys Gly Ala Gln Thr Gly Gly Tyr Phe Gly
1 5 10 15
Gln

<210> 19
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..24
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 19
Arg Leu Thr Glu Met Gly Ala Cys Asp Ala Arg Trp Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Phe Ala Tyr Asn Tyr
 20

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 20
Gln Lys Lys Asp Arg Thr Arg Trp Ala Glu Pro Arg Glu Trp Asn Asn
1 5 10 15

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

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..21
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"

/organism="artificial sequences"

<400> 21

Gly Ser Arg Phe Ser Ser Pro Val Gly Ser Thr Ser Arg Leu Glu Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Tyr Asn Tyr
 20

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<220>

<221> MOD_RES

<222> 11

<223> Xaa can be any naturally occuring amino acid

<400> 22

Ala Asp Pro Ser Ile Tyr Tyr Ser Ile Leu Xaa Ile Glu Tyr Lys Tyr
 1 5 10 15

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..22

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 23

Asp Ser Pro Cys Tyr Met Pro Thr Met Pro Ala Pro Pro Ile Arg Asp
 1 5 10 15
 Ser Phe Gly Trp Asp Asp
 20

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..15
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 24
Thr Ser Ser Phe Tyr Trp Tyr Cys Thr Thr Ala Pro Tyr Asn Val
1 5 10 15

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..16
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 25
Thr Glu Ile Glu Trp Tyr Gly Cys Asn Leu Arg Thr Thr Phe Thr Arg
1 5 10 15

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..22
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 26

Asn Gln Leu Ala Gly Gly Trp Tyr Leu Asp Pro Asn Tyr Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Ala Tyr Ala Ile
 20

<210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..24
 <223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 27
 Arg Leu Thr Glu Met Gly Ala Cys Asp Ala Arg Trp Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Phe Ala Tyr Asn Tyr
 20

<210> 28
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..24
 <223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 28
 Asp Gly Trp Thr Arg Lys Glu Gly Gly Ile Gly Leu Pro Trp Ser Val
 1 5 10 15
 Gln Cys Glu Asp Gly Tyr Asn Tyr
 20

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..10
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 29
Asp Ser Tyr Pro Cys His Leu Leu Asp Val
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..12
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CDR3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 30
Val Glu Tyr Pro Ile Ala Asp Met Cys Ser Arg Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..27
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH2 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 31
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Thr Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Thr Leu Thr Pro
 20 25

<210> 32

<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..27
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH2 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 32
Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Thr Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
 20 25

<210> 33
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..27
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH2 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 33
Ala Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
 20 25

<210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..27
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH2 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 34

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro
 20 25

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..12

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CH3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 35

Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala
1 5 10

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..18

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein CH3 domain"
 /organism="artificial sequences"

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 36

Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro Xaa Arg Leu
1 5 10 15
Glu Leu

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..18
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 37
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..18
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH3 domain"
/organism="artificial sequences"

<400> 38
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..18
<223> /mol_type="protein"
/note="Antigen-Binding protein CH3 domain"

/organism="artificial sequences"

<400> 39

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..12

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein Hinge domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 40

Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Cys Pro Lys Cys Pro
 1 5 10

<210> 41

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..35

<223> /mol_type="protein"
 /note="Antigen-Binding protein Hinge domain"
 /organism="artificial sequences"

<400> 41

Glu Pro Lys Ile Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln
 1 5 10 15
 Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu Cys Thr Cys Pro
 20 25 30
 Lys Cys Pro
 35

104年12月30日修(改)正本

公告本

申請專利範圍

1. 一種純化非人類之基因轉殖動物的乳汁所製造之基因轉殖人類第七凝血因子(TgFVII)及/或基因轉殖活化態人類第七凝血因子(TgFVIIa)之方法，其包含親和性層析之步驟，該親和性層析之步驟包括：
 - (a)使含有人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 之非人類之基因轉殖動物的乳汁，與對人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 具有專一性之配體，在允許人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 與該配體結合之條件下，互相接觸，其中該配體不具輕多肽鏈，以及
 - (b)利用非破壞性方式擾亂與該配體的交互作用，回收人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa，其中該配體具有對人類 TgFVII 或人類 TgFVIIa 高於 1 μM 之親和力。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該配體為導向人類 TgFVII 及人類 TgFVIIa 之至少一個的抗原決定位、功能性片段或其衍生物之抗原結合蛋白。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該配體包含形成兩個完整抗原結合位的兩條重多肽鏈。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該配體衍生自駱駝科的重免疫球蛋白鏈。
5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，步驟(b)包含至少一個在將人類 TgFVII 或人類 TgFVIIa 溶析離開該配體之前，移除未結合材料之洗滌步驟，更選擇性地包含移除弱結合

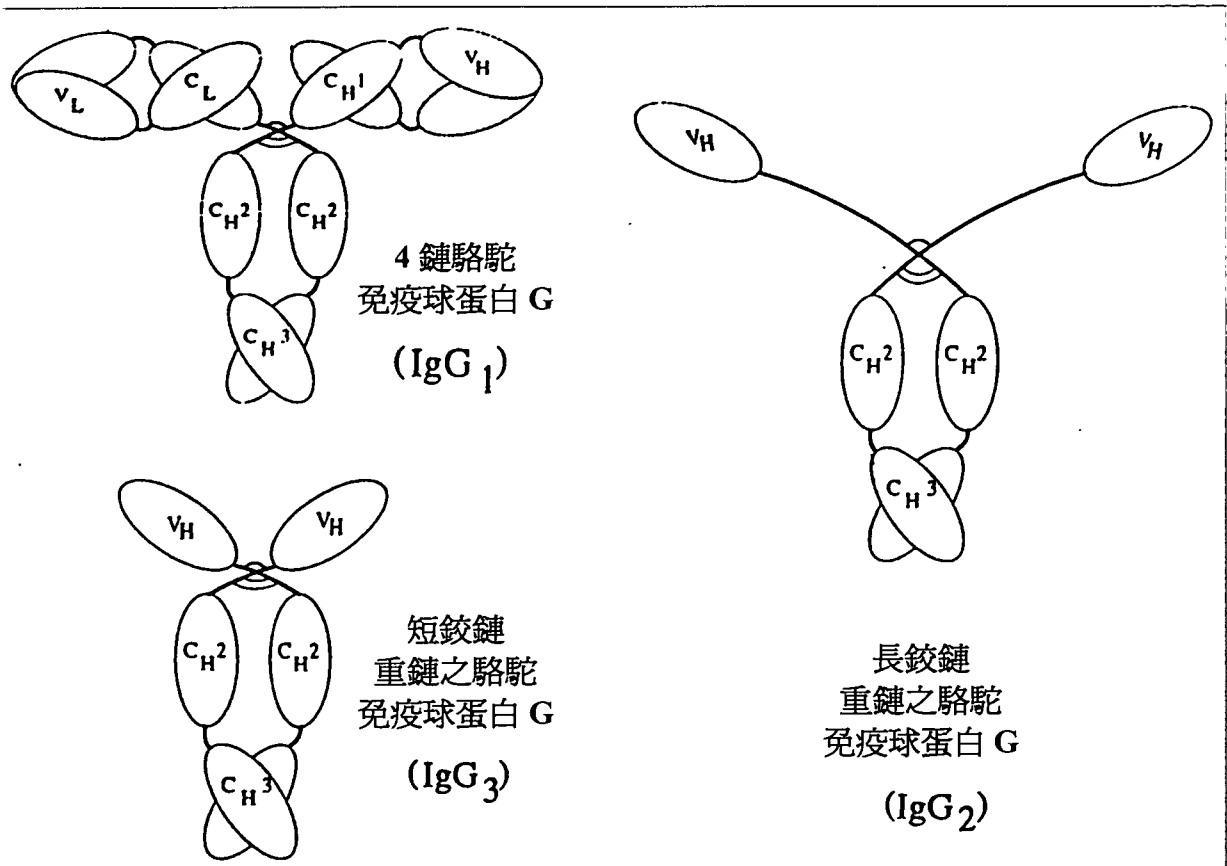
材料的二次洗滌步驟。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中，該動物為雌性哺乳類。
7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中，該雌性哺乳類為雌兔。
8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含在步驟(a)前，收集及澄清乳汁的初步步驟。
9. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該乳汁澄清步驟係透過添加檸檬酸鹽而後過濾來進行。
10. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含步驟(c)於離子交換器中，在人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 留存於該離子交換器之條件下，對該溶析出之人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 進行層析純化。
11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該離子交換器為陰離子交換器。
12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含步驟(d)於偽親和性樹脂中，在人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 留存於該偽親和性樹脂的條件下，對該溶析出之人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 進行層析分離。
13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該偽親和性樹脂為經磷灰石。
14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含步驟(e)於粒徑篩析載體中，對該溶析出之人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 進行層析分離。

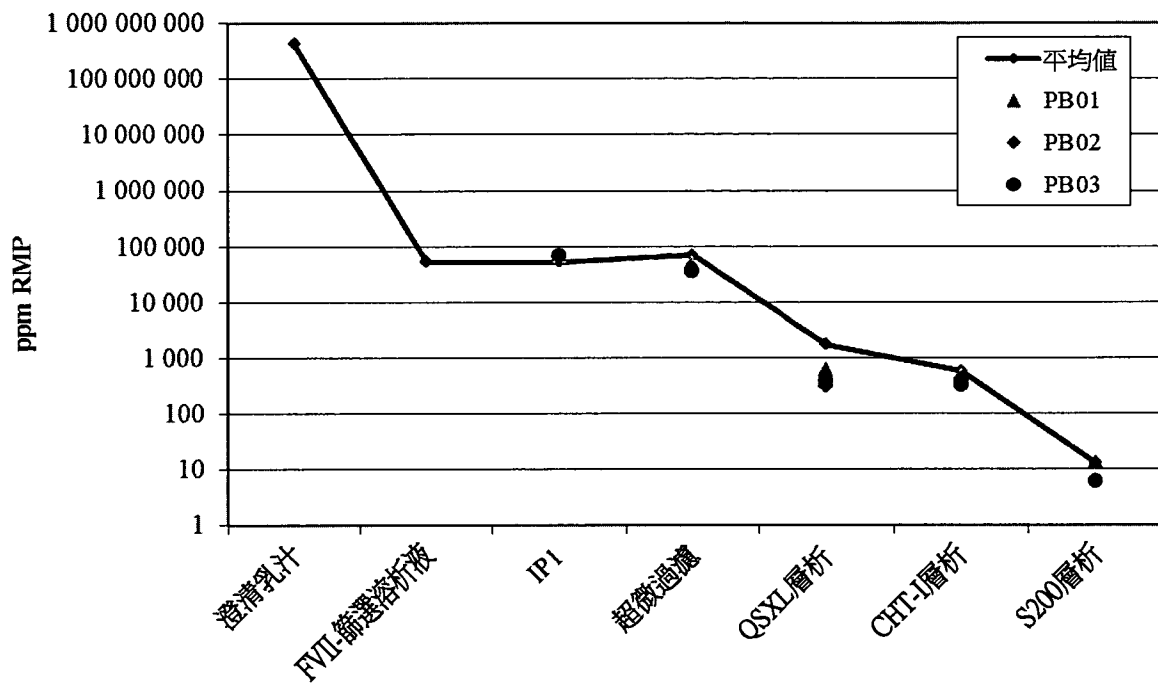
15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含至少一個將病毒去除及/或去活化之步驟。
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該將病毒去除及/或去活化之步驟係藉由超微過濾及/或溶劑/清潔劑處理而實行。
17. 如申請專利範圍第 1 項之方法，更包含配製、滅菌及冷凍乾燥該純化之人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 之最終步驟。
18. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該親和性層析之步驟包含下列步驟：
 - (a) 將取自於含有重組產生的人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 之基因轉殖雌兔的乳汁，注入固定有如專利申請範圍第 1 項至第 4 項任一項定義之配體的層析樹脂中，在允許該配體與人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 結合之條件下；
 - (b1) 洗滌未結合之材料；
 - (b2) 洗滌弱結合之材料；以及
 - (b3) 自該樹脂溶析出人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa。
19. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中，在進行前述之親和性層析步驟時，上述移除弱結合材料的二次洗滌步驟係以包含 10%至 50%疏水劑、且其離子強度範圍為 200mM 至 600mM 之緩衝液來進行。
20. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中，在進行前述之親和性層析步驟時，上述自該樹脂溶析出人類 TgFVII 及/或人類 TgFVIIa 之溶析步驟係以包含 20%至 70%疏水劑、且其離子強度範圍為 500mM 至 2500mM 之緩衝液進行。

21. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，所得的該純化之基因轉殖合成人類 FVII 為幾乎完全活化、高純度的人類 FVII，包含微量的降解態、水解態或氧化態。
22. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該親和性層析步驟及/或離子交換層析步驟及/或粒徑篩析層析步驟允許得到高於 $3 \log_{10}$ 的病毒折減因數。
23. 如申請專利範圍第 22 項之方法，該親和性層析步驟及/或離子交換層析步驟及/或粒徑篩析層析步驟允許得到高於 $4 \log_{10}$ 的病毒折減因數。
24. 如申請專利範圍第 22 項之方法，該親和性層析步驟及/或離子交換層析步驟及/或粒徑篩析層析步驟允許得到高於 $5 \log_{10}$ 的病毒折減因數。

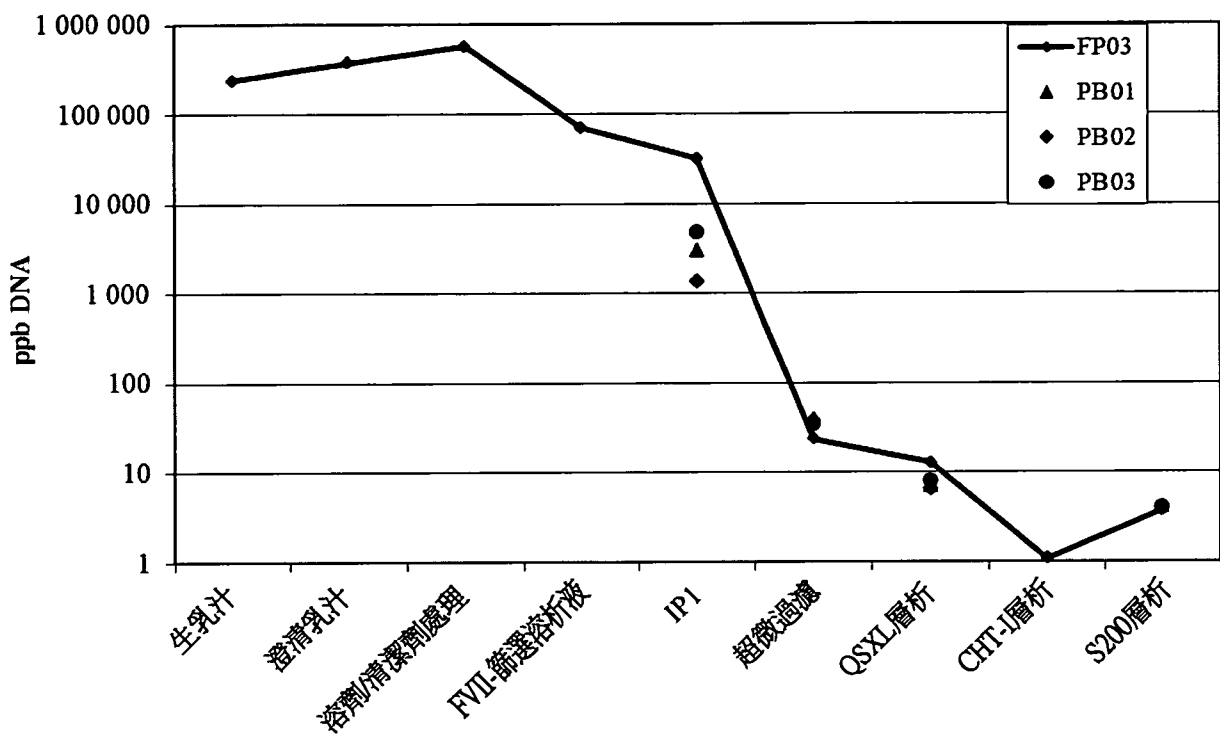
圖式



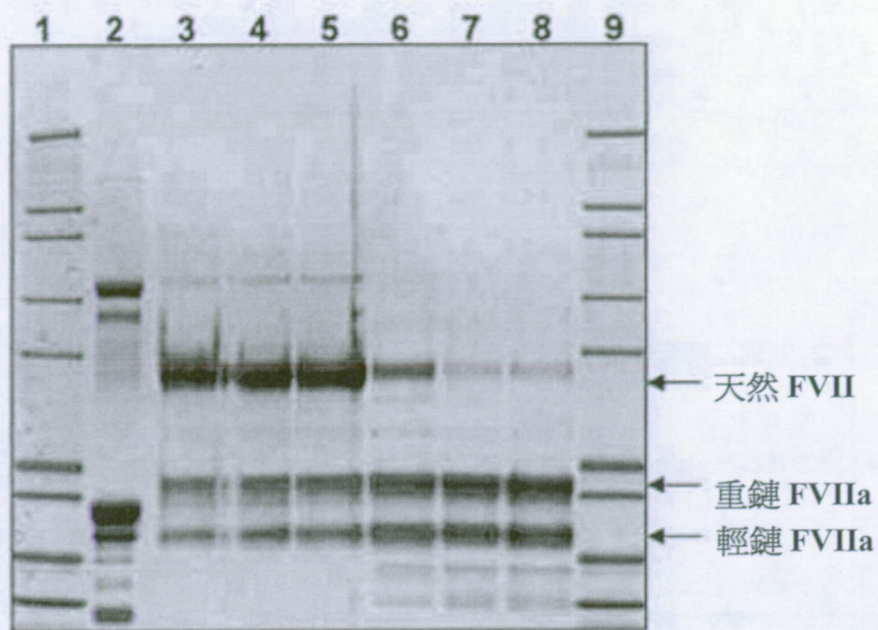
第 1 圖



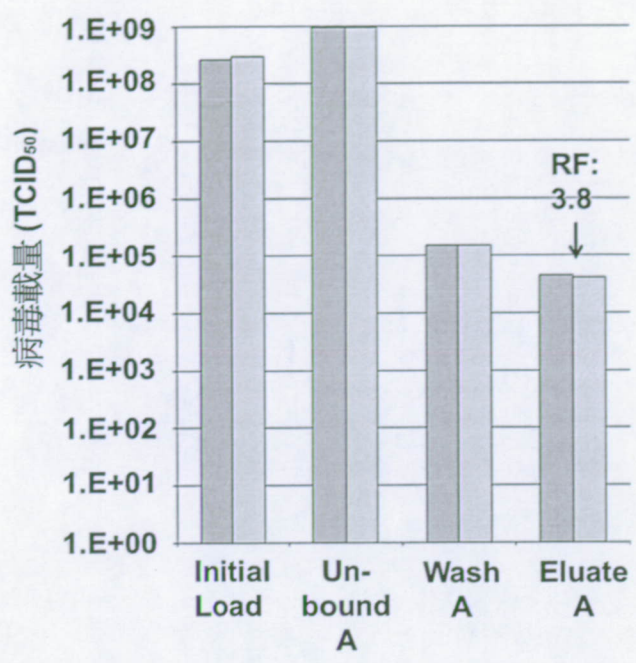
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖