

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480035708.5

[51] Int. Cl.

C07K 1/34 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
G12N 9/64 (2006.01)
G12N 7/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 3 日

[11] 公开号 CN 1890257A

[22] 申请日 2004. 12. 1

[21] 申请号 200480035708.5

[30] 优先权

[32] 2003. 12. 1 [33] DK [31] PA200301775

[86] 国际申请 PCT/EP2004/053206 2004. 12. 1

[87] 国际公布 WO2005/054275 英 2005. 6. 16

[85] 进入国家阶段日期 2006. 6. 1

[71] 申请人 诺和诺德医疗保健公司

地址 瑞士苏黎士

[72] 发明人 J·克里斯滕森 E·豪客雅尔

T·普鲁斯 T·B·汉森

L·V·M·托莫达 N·约翰森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 6 页 说明书 29 页 附图 1 页

[54] 发明名称

液体因子Ⅶ组合物的病毒过滤

[57] 摘要

本发明涉及用于提高液体因子Ⅶ组合物、特别是那些包含活性因子Ⅶ多肽(因子Ⅶa 多肽)的组合物的病毒安全性的新型方法。

1. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法, 所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽, 所述的一种或者多种因子 VII 多肽中至少 5% 是以活化形式存在的, 所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述一种或者多种因子 VII 多肽中至少 7%, 例如至少 10% 是以活化形式存在的。
3. 根据权利要求 1 的方法, 其中因子 VII 多肽的活化形式占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 5-70%, 例如 7-40%, 如 10-30%。
4. 根据权利要求 1 的方法, 其中因子 VII 多肽的活化形式占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 50-100%, 例如 70-100%, 如 80-100%。
5. 根据权利要求 1 的方法, 其中因子 VII 多肽的活化形式占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 20-80%, 例如 30-70%, 如 30-60%。
6. 根据前面任何权利要求的方法, 其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内, 如在 7.6-9.4 的范围内, 例如在 7.7-9.3 的范围内, 如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。
7. 根据前面任何权利要求的方法, 其中在液体组合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内, 例如在 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。
8. 根据前面任何权利要求的方法, 其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm, 如至多 30nm, 例如在 10-30nm 范围内。

9. 根据前面任何权利要求的方法，其中所述纳滤器的膜由选自下列的一种或者多种材料制成：铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯(PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

10. 根据前面任何权利要求的方法，其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

11. 根据前面任何权利要求的方法，其中所述液体组合物是基本上无血清的。

12. 根据权利要求 1-10 中任何一项的方法，其中所述因子 VII 多肽是在牛血清或胎牛血清存在下通过细胞培养产生的。

13. 根据前面任何权利要求的方法，其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中所述因子 VII 多肽是在没有任何动物来源成分的培养基中，在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

15. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法，所述组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，所述液体组合物基本没有血清，所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

17. 根据权利要求 15 或 16 的方法，其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

18. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在没有任何动物来源成分的培养基中, 在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

19. 根据权利要求 15-18 中任何一项的方法, 其中所述一种或者多种因子 VII 多肽中的至少 5% 是以活化形式存在的。

20. 根据权利要求 15-19 中任何一项的方法, 其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内, 如在 7.6-9.4 的范围内, 例如在 7.7-9.3 的范围内, 如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。

21. 根据权利要求 15-20 中任何一项的方法, 其中在所述液体组合合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内, 例如 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。

22. 根据权利要求 15-21 中任何一项的方法, 其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm, 如至多 30nm, 例如在 10-30nm 范围内。

23. 根据权利要求 15-22 中任何一项的方法, 其中所述纳滤器的膜由选自下列的一种或者多种材料制成: 铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

24. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法, 所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽, 所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤, 所述纳滤器具有由选自下列的一种或者多种材料制成的膜: 铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述材料选自基于聚偏二氟乙

烯的材料和基于聚醚砜的材料。

26. 根据权利要求 24-25 中任何一项的方法,其中所述一种或者多种因子 VII 多肽的至少 5%是以活化形式存在的。

27. 根据权利要求 24-26 中任何一项的方法,其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内,如在 7.6-9.4 的范围内,例如在 7.7-9.3 的范围内,如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。

28. 根据权利要求 24-27 中任何一项的方法,其中在所述液体组合合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内,例如在 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。

29. 根据权利要求 24-28 中任何一项的方法,其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm,如至多 30nm,例如在 10-30nm 范围内。

30. 根据权利要求 24-29 中任何一项的方法,其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

31. 根据权利要求 24-30 中任何一项的方法,其中所述液体组合物是基本上无血清的。

32. 根据权利要求 24-31 中任何一项的方法,其中所述因子 VII 多肽是在牛血清或胎牛血清存在下通过细胞培养产生的。

33. 根据权利要求 24-32 中任何一项的方法,其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

34. 根据权利要求 33 的方法,其中所述因子 VII 多肽是在没有任

何动物来源成分的培养基中，在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

35. 灭活液体因子 VII 组合物中的病毒的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，该方法包括将所述组合物与去污剂相组合的步骤。

36. 根据权利要求 35 的方法，其中所述去污剂是具有化学式 $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_2)_2)-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$ 的辛基苯氧基聚乙氧基乙醇，其中 n 在 5-15 的范围内。

37. 根据权利要求 36 的方法，其中所述去污剂是 n 为 9-10 的化合物，例如 Triton X-100。

38. 根据权利要求 35 的方法，其中所述去污剂选自由下列各项组成的组：Tween®，聚山梨酸酯 20，聚山梨酸酯 60，和聚山梨酸酯 80。

39. 根据权利要求 35-38 中任何一项的方法，其中所述去污剂与所述液体因子 VII 组合物相组合，使得组合物中去污剂的浓度在 0.01-0.3%（重量）范围内，例如在 0.05-0.2%（重量）范围内。

40. 根据权利要求 35-39 中任何一项的方法，其中将所述去污剂在 2-12℃ 的温度范围内、例如 2-9℃ 的范围内与所述组合物相组合。

41. 根据权利要求 35-40 中任何一项的方法，其中所述去污剂基本没有磷酸三烷基酯溶剂，例如磷酸三（正丁基）酯。

42. 高水平地消除液体因子 VII 组合物中活性病毒的存在的方法，该方法包括如下步骤：(i) 使用根据权利要求 35-41 中任何一项定义的方法灭活病毒，和 (ii) 使用根据权利要求 1-35 中任何一项定义的方法

去除病毒，所述步骤可以是任何顺序。

43. 根据权利要求 42 的方法，其中灭活病毒的步骤在去除病毒的步骤之前。

液体因子 VII 组合物的病毒过滤

本发明涉及用于改善液体因子 VII 组合物、特别是那些包含活性因子 VII 多肽（因子 VIIa 多肽）的组合物的病毒安全性的新型方法。

发明背景

已经确定了参与血液凝固过程的多种因子，包括因子 VII (FVII)，一种血浆糖蛋白。止血是通过在血管壁损伤之后暴露于循环血液的组织因子 (TF) 与在循环中存在的因子 VIIa（其在循环中的量占总因子 VII 蛋白量的大约 1%）之间形成复合物起始的。因子 VII 在血浆中主要以单链的酶原形式存在，酶原被因子 Xa 切割成为双链、活性形式的因子 VIIa。已经开发出重组的活化因子 VIIa (rFVIIa) 作为止血促进剂。rFVIIa 的给药为具有出血的血友病受治疗者提供了迅速和高效的促凝血应答，由于抗体形成，所以不能使用其他的凝血因子产物对这些受治疗者进行治疗。而且，可以使用因子 VIIa 成功治疗在有因子 VII 缺陷的受治疗者或者具有正常凝血系统但是出现过度出血的受治疗者中的出血。

对因子 VII 的纯化和处理必须要小心，原因是该分子具有降解的可能性。因子 VII 和因子 VIIa 是大分子（分子量大约是 50kD），易于受到由于在纯化和过滤中的剪切力造成的机械降解。而且，因子 VIIa 是活性的蛋白水解酶，它降解其他蛋白质，包括因子 VIIa。因子 VIIa 的降解主要包括因子 VIIa 重链中的切割，特别是在该分子中的第 290 和 315 位氨基酸处。最后，因子 VII 和因子 VIIa 中的甲硫氨酸残基可能会被氧化。

本发明的目的是提供从液体因子 VII 组合物中去除病毒或者使病毒失活的方法，通过这个方法，因子 VII 组分的完整性基本上得到

保持。

WO 96/00237 公开了含有大分子（例如蛋白质，如血浆蛋白因子 IX）的溶液的病毒过滤的方法。

WO 98/37086 公开了使用具有平均孔径大小为 15nm 的膜通过纳滤（nanofiltration）从血浆来源的蛋白质溶液中除去病毒。

Tomokiyo 等, Vox Sanguinis, 2003, 84, 54-64 公开了人血浆衍生的活化因子 VII 浓缩物的大规模制备。该制备方法包括对包含无活性因子 VII 的溶液进行病毒过滤的步骤。

发明概述

在广义的方面,本发明涉及去除因子 VII 组合物中的病毒和/或使其失活的方法。如这里所使用的,术语“病毒”指的是任何超显微的感染性物质,它们只能在活宿主的细胞内进行自我复制,或者是指来自感染性物质的非感染性颗粒。在一个实施方案中,病毒是感染性的。在一个实施方案中,病毒是非感染性的病毒颗粒。

本发明的第一方面涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法,所述的方法包括使用具有孔径大小至多为 80nm 的纳滤器（nanofilter）对所述的溶液进行纳滤。

本发明的第二方面涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法,所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽,所述的一种或者多种因子 VII 多肽的至少 5%呈活化形式,所述的方法包括使用具有孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述的溶液进行纳滤。

本发明的第三方面涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法

法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，所述的液体组合物基本上不含血清，所述的方法包括使用具有孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述的溶液进行纳滤。

本发明的另一方面涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，所述的方法包括使用具有孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述的溶液进行纳滤，所述的纳滤膜具有由选自下列的一种或者多种材料制成的膜：铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 以及聚醚砜。

本发明的另一方面涉及灭活液体因子 VII 组合物中的病毒的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，该方法包括将去污剂与所述组合物相组合的步骤。

本发明的另一方面涉及从液体因子 VII 组合物中高水平地消除活性病毒存在的方法，该方法包括 (i) 灭活病毒和 (ii) 除去病毒的步骤。

附图的简要描述

图 1 示意阐明了适于本发明方法的系统。该系统包括可以提供压缩空气的压力罐 (1)，用于除去会堵塞病毒滤器的颗粒的预过滤器 (2)，压力计 (P)，病毒滤器 (3) 和储液罐 (4)。

发明详述

本发明提供了从通常包含显著比例的活化的、所以具有蛋白水解活性的因子 VII 多肽的液体因子 VII 组合物中去除病毒、包括无包膜病毒或使其灭活的方法。该方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对液体因子 VII 组合物进行纳滤的步骤。

该方法对于去除有包膜病毒以及无包膜病毒特别有用，例如小鼠

白血病病毒（有包膜）可以使用孔径大小约为 50nm 的滤器除去，猪细小病毒（无包膜）可以使用孔径大小约为 20nm 的滤器除去。

液体因子 VII 组合物，例如那些包含显著比例的活化因子 VII 多肽的组合物，原则上可以由干的因子 VII 成分制备，但是更经常的是从大规模制备工艺，例如包括重组技术的工艺中获得。在这些工艺中，通常收获细胞培养物上清液，接下来对其进行一个或者更多个处理步骤，包括但是不限于离心或者过滤以除去未固定在载体中的细胞；亲和层析、疏水相互作用层析；离子交换层析；大小排阻层析；电泳步骤（例如制备型等电聚焦（IEF））、差异溶解性（例如硫酸铵沉淀）或者提取等等，获得所需的蛋白。一般地，参见 Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York, 1982; 和 *Protein Purification*, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989。因子 VII 多肽的纯化还可以包括例如在抗因子 VII 抗体柱上进行的亲和层析（参见例如，Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261:11097, 1986; 以及 Thim et al., *Biochem.* 27:7785, 1988）以及使用因子 XIIa 或者其他具有胰蛋白酶样特异性的蛋白酶例如因子 IXa、激肽释放酶、因子 Xa 和凝血酶，经蛋白酶剪切的活化。参见例如，Osterud et al., *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, 美国专利 No. 4,456,591; 和 Hedner et al., *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983)。或者，可以将因子 VII 多肽通过离子交换层析柱，例如 Mono Q® (Pharmacia) 等而使其活化。

本发明的方法对于大规模生产工艺特别有用。术语“大规模”通常指的是其中液体因子 VII 多肽组合物的体积至少是 100L，例如至少 500L，如至少 1000L 或者至少 5000L 的方法。这不以任何方式构成限制，因为本发明也可以用于小于 100L 的液体因子 VII 多肽组合物。

现在已经认识到，甚至在批量因子 VII 多肽被部分或者完全活化

之后也可以进行纳滤。

这样，本发明的方法适合作为因子 VII 多肽整体纯化工艺步骤中的一步，通常是纯化工艺最后步骤中的一步。

更为具体地，由从发酵培养液（或从人或者哺乳动物的血浆）中收获的材料开始的典型纯化工艺可以概括如下：

纯化步骤 病毒过滤的可能阶段

收获

↓

1

捕获

↓

2

中间物纯化

↓

3

精制

↓

4

药物物质

活化形式的因子 VII 多肽的含量最初（即从收获步骤开始）通常是大约 2%，在纯化过程中提高到 90%或者更多，直至多肽作为药物物质获得。

进行纳滤的液体因子 VII 组合物包含在适宜溶剂中的一种或者多种因子 VII 多肽。溶剂通常是水或者水性混合物/溶液如纯水，水性缓冲液、水/乙醇混合物、水/DMSO 混合物或者盐的水溶液例如盐水、尿素溶液或者胍溶液。适宜的水性溶液还可以包含去污剂（表面活性剂）。

在有趣的实施方案中，液体因子 VII 组合物从细胞培养上清液（例如如 WO 02/29084 中公开的所获得的细胞培养上清液）中获得或者来

源于此。在一个实施方案中，液体因子 VII 组合物是无血清的，即不含动物来源的组分。这样，细胞培养物可以在没有动物来源组分的培养基中培养。

一种吸引人的变化形式是在 CHO 细胞（例如没有任何动物来源组分的培养基或者没有动物来源组分以及没有蛋白质（“无蛋白的”）的培养基中的 CHO 细胞）中通过细胞培养生产的因子 VII 多肽。

用于 CHO 细胞的培养基可以是任何可商购的无动物来源组分的无蛋白的 CHO 培养基或者内部生产的用于 CHO 细胞的培养基。

在一些实施方案中，使实施本发明使用的细胞适合于在无动物来源组分的培养基（例如无血清培养基）中悬浮培养。这种适应的步骤在例如 Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (BHK 和 CHO 细胞); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11:117-120, 1997 (昆虫细胞); Keen, *Cytotechnol.* 17:203-211, 1995 (骨髓瘤细胞); Berg et al., *Biotechniques* 14: 972-978, 1993 (人肾 293 细胞)中描述。在特定的实施方案中，宿主细胞是已经被工程化加工而表达人因子 VII 或者因子 VII 多肽，并且已经适合于在没有血清或者动物来源组分的条件下生长的 BHK 21 或者 CHO 细胞。

在另一个实施方案中，因子 VII 多肽在有牛血清或胎牛血清存在的情况下通过细胞培养产生。

根据本发明的一个方面，一个特点是显著比例（即至少 5%，如至少 7%，例如至少 10%）的所述一种或者多种因子 VII 多肽以活化形式（即因子 VII 多肽的生物活性的、切割的形式（即因子 VIIa 多肽））

存在。在另外的实施方案中，因子 VIIa 多肽占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 5-70%，如 7-40%，例如 10-30%。在其他实施方案中，因子 VIIa 多肽占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 50-100%，如 70-100%，例如 80-100%。在其他实施方案中，因子 VIIa 多肽占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 20-80%，如 30-70%，例如 30-60%。

在大多数实施方案中，所述溶液包含无活性形式的因子 VII 多肽以及生物活性的因子 VIIa 多肽，即因子 VIIa 多肽占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 100%以下。在最典型的实施方案中，组合物中包含（活化的）因子 VIIa 多肽，它对应于（无活性的）因子 VII 多肽，即因子 VIIa 多肽是因子 VII 多肽的活化形式。在其他实施方案中，因子 VIIa 多肽与未活化的因子 VII 多肽的活化形式有些不同。当然，应当理解，在特定实施方案中，组合物可能包含一种以上的因子 VII 多肽和一种以上的因子 VIIa 多肽。

术语“一种或多种因子 VII 多肽”包括野生型因子 VII（即具有美国专利 No. 4,784,950 中公开的氨基酸序列的多肽）以及与野生型因子 VII 相比表现基本相同或者具有提高的生物活性的因子 VII 变体。术语“因子 VII”旨在包括未切割（酶原）形式的因子 VII 多肽，以及那些已经经过蛋白水解处理、产生其相应的生物活性形式的因子 VII 多肽，它们可以被命名为因子 VIIa。通常因子 VII 在 152 和 153 位残基之间被切割，产生因子 VIIa。术语“因子 VIIa”特别地指活化的（即生物活性的，切割的）因子 VII 多肽。因此，相对于“因子 VII”而言，“因子 VIIa”是一个亚组。术语“无活性的因子 VII”特别地指不是因子 VIIa 的因子 VII。

术语“因子 VII 多肽”还包括其中因子 VIIa 的生物活性与野生型因子 VIIa 的活性相比被实质性改变或者略有降低的多肽，包括变体，以及因子 VII 衍生物和因子 VII 偶联物。这些多肽包括，但是不限于

其中已经引入了改变或者破坏所述多肽的生物活性的特定氨基酸序列改变的因子 VII 或者因子 VIIa。如这里使用的, 术语“因子 VII 衍生物”指的是野生型因子 VII, 与野生型因子 VII 和因子 VII 相关多肽相比表现出基本相同或者提高的生物活性的因子 VII 变体, 其中亲本多肽中一个或者多个氨基酸已经过化学和/或酶学修饰, 例如烷基化、糖基化、PEG 化、酰化、形成酯或者形成酰胺等等。这包括但是不限于 PEG 化的人因子 VIIa、半胱氨酸 PEG 化的人因子 VIIa 及其变体。因子 VII 衍生物的非限制性的实例包括 WO 03/31464 和 美国专利申请 US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557, 和 US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.) 中公开的糖基 PEG 化的 FVII 衍生物; 如 WO 01/04287, 美国专利申请 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) 和 WO 02/02764, 美国专利申请 20030211094 (University of Minnesota) 中公开的 FVII 偶联物。

术语“PEG 化的人因子 VIIa”指的是具有与人因子 VIIa 多肽偶联的 PEG 分子的人因子 VIIa。应当理解 PEG 分子可以连接在因子 VIIa 多肽的任何部分处, 包括因子 VIIa 多肽的任何氨基酸残基或者糖部分上。术语“半胱氨酸 PEG 化的人因子 VIIa”指的是具有与导入到人因子 VIIa 中的半胱氨酸上的巯基偶联的 PEG 分子的因子 VIIa。

在血液凝固中因子 VIIa 的生物活性来自其 (i) 与组织因子 (TF) 结合以及 (ii) 催化因子 IX 或者因子 X 的蛋白酶剪切产生活化的因子 IX 或 X (分别是因子 IXa 或 Xa) 的能力。

对于本发明的目的, 因子 VII 多肽的生物活性 (“因子 VII 的生物活性”) 可以通过使用缺少因子 VII 的血浆和 促凝血酶原激酶测量制剂促进血液凝固的能力来进行定量, 如美国专利 No. 5, 997, 864 或 WO 92/15686 中所述。在这个检测中, 生物活性表示为凝血时间相对

于对照样品的缩减,并通过与含有 1 单位/毫升因子 VII 活性的合并人血清标准品进行比较将其转化为“因子 VII 单位”。或者可以通过 (i) 测定因子 VIIa (或者因子 VII 多肽) 在包含包埋于脂膜内的 TF 和因子 X 的系统中产生活化的因子 X (因子 Xa) 的能力 (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997)); (ii) 测定在水性系统中的因子 X 水解 (“体外蛋白水解检测”, 参见下面); (iii) 使用基于表面等离子共振的仪器测定因子 VIIa (或者因子 VII 多肽) 与 TF 的物理结合 (Persson, FEBS Letts. 413: 359-363, 1997); (iv) 测定合成底物被因子 VIIa (或者因子 VII 多肽) 的水解 (“体外水解检测”, 参见下面); 或者 (v) 在不依赖于 TF 的体外系统中测定凝血酶的产生, 对因子 VIIa 的生物活性进行定量。

具有相对于野生型因子 VIIa 而言基本相同或者提高的生物活性的因子 VII 变体包括在如上描述的凝血检测、蛋白水解检测或者 TF 结合检测中的一种或多种检测法中检测时表现出在相同细胞类型中产生的因子 VIIa 比活性的至少大约 25%, 如至少大约 50%, 如至少大约 75%, 如至少大约 90% 的那些因子 VII 变体。在一个实施方案中, 其生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 80% 以上。在另一个实施方案中, 其生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 90% 以上。在另一个实施方案中, 该生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 100% 以上。在另一个实施方案中, 该生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 120% 以上。在另一个实施方案中, 该生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 200% 以上。在另一个实施方案中, 该生物活性是重组野生型人因子 VIIa 生物活性的 400% 以上。

具有相对于野生型因子 VIIa 而言显著降低的生物活性的 VII 变体包括在如上描述的凝血检测、蛋白水解检测或者 TF 结合检测中一种或多种检测法中检测时表现出在相同细胞类型中产生的野生型因子 VIIa 比活性的大约 25% 以下, 如大约 10% 以下, 如大约 5% 以下, 如大

约 1%以下的那些因子 VII 变体。具有相对于野生型因子 VII 而言实质性改变的生物活性的因子 VII 变体包括、但不限于表现出不依赖于 TF 的因子 X 蛋白水解活性的因子 VII 变体以及那些结合 TF 但是不切割因子 X 的因子 VII 变体。

因子 VII 的变体，不论是表现出与野生型因子 VII 相比基本上相同或者更好的生物活性，还是表现出与野生型因子 VII 相比实质性改变或者降低的生物活性，均包括、但不限于具有通过插入、缺失或者取代一个或多个氨基酸而与野生型因子 VII 的氨基酸序列不同的氨基酸序列的多肽。

与野生型因子 VII 具有基本相同的生物活性的非限制性的因子 VII 变体实例包括 S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); 如美国专利 No. 5,580,560 中公开的表现出增强的蛋白水解稳定性的因子 VIIa 变体; 在 290 和 291 位残基之间或者在 315 和 316 位残基之间已被蛋白酶剪切的因子 VIIa (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505, 1995); 因子 VIIa 的氧化形式 (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363: 43-54, 1999); 如 PCT/DK02/00189 中公开的因子 VII 变体; 以及如 WO 02/38162 (Scripps Research Institute) 中公开的表现出增强的蛋白水解稳定性的因子 VII 变体; 如 WO 99/20767, 美国专利 US 6017882 和 US 6747003, 美国专利申请 20030100506 (University of Minnesota) 和 WO 00/66753, 美国专利申请 US 20010018414, US 2004220106, 和 US 200131005, 美国专利 US 6762286 和 US 6693075 (University of Minnesota) 中公开的具有修饰的 Gla 结构域并表现出膜结合增强的因子 VII 变体; 以及如 WO 01/58935, 美国专利 US 6806063, 美国专利申请 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS) 和 WO 04/029091 (Maxygen ApS) 中公开的因子 VII 变体。

与野生型因子 VIIa 相比其生物活性提高的因子 VII 变体的非限制性实例包括, 如 WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute) 中公开的因子 VII 变体; 以及如 JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.) 中公开的具有提高活性的因子 VIIa 变体。

与野生型因子 VII 相比其生物活性显著降低或者改变了的因子 VII 变体的非限制性实例包括 R152E-FVIIa (Wildgoose et al., Biochem 29: 3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., J. Biol. Chem. 270: 66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15: 515-520, 1998), 以及缺少 Gla 结构域的因子 VIIa (Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317: 245-249, 1993)。

因子 VII 多肽的明确实例包括、但不限于野生型因子 VII,

L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, and S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII,

K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII,
K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII,
K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII,
S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII,
S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII,
S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII,
S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII,
S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII,
S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII,
S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII,
K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII,
K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-
FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII,
K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII,
K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII,
K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII,
K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,
K316H/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII,
K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII,
K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-
FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII,
K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII,
K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII,
K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII,
K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,
K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII,
F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII,
F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII,
F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII,
F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII,
F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII,
F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII,

F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII,
F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII,
F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII,
F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII,
F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII,
F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,
F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,
F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII,
F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII,
F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII,
F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII,
F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,
F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,
F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII,
F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,
F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,
F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A -FVII,
F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,
F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,
F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-
FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,
F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-
FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-
FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-因子 VII, S60A-因子 VII;

R152E-因子 VII, S344A-因子 VII, 缺少 Glα 结构域的因子 VIIa; 以

及 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; 以及在氨基酸序列 233Thr 到 240Asn 中具有取代、添加或者缺失的因子 VII, 在氨基酸序列 304Arg 到 329Cys 中具有取代、添加或者缺失的因子 VII。

在一些实施方案中, 因子 VIIa 多肽是人因子 VIIa (hFVIIa), 例如重组制备的人因子 VIIa (rhFVIIa)。在其他实施方案中, 所述一种或多种因子 VII 多肽包含因子 VII 序列变体。在一些实施方案中, 所述一种或多种因子 VII 多肽具有与野生型因子 VII 不同的糖基化。

纳滤

使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对液体因子 VII 组合物进行纳滤。更特别地, 纳滤器的孔径大小至多为 50nm, 例如至多 30nm, 如在 10-30nm 的范围内。

术语“孔径大小”通常指的是被滤器所截住的最小病毒的大小。

适宜的可商购的纳滤器实例是 Asahi Planove 15 N, Asahi Planove 20 N, Asahi Planova 35 N, 和 Asahi Planova 75 N (全部来自 Asahi Chemical, Tokyo, Japan); Millipore NFR, Millipore NFP, Millipore Viresolve 70, 和 Millipore Viresolve 180 (全部来自 Millipore); 以及 Pall DV20, Pall DV 50, Pall Omega VR 100 K; 和 Bemberg Microporous Membrane-15 nm (BMM-15)。

纳滤器的膜可以例如由选自下列的一种或者多种材料制成: 铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF、聚醚砜以及类似的材料。在一个实施方案中, 所述材料选自基于聚偏二氟乙烯的材料和基于聚醚砜的材料。

可以使用切向流过滤的方式或者死端过滤的方式进行纳滤，技术人员可以理解这一点。在一个实施方案中，使用死端过滤的方式进行纳滤。

不认为进行纳滤的液体因子 VII 组合物的 pH 值是非常关键的。因此，通常考虑到紧挨在纳滤步骤之前的工艺步骤中应用的条件给出 pH 值。在一些实施方案中，调节 pH 值以使液体组合物具有的 pH 在 5.5-10 的范围，例如在 7.0-9.5 的范围，如在 7.6-9.4 的范围；例如在 7.7-9.3 的范围，如在 8.0-9.0 的范围或者在 8.3-8.7 的范围。在一个实施方案中，该 pH 在 5-7 的范围内。在一个实施方案中，该 pH 高于 9.5，例如在 9.5-10 的范围。

此外，在液体组合物中因子 VII 多肽的浓度通常也由前面的工艺步骤给出，但是通常在 0.01-5mg/ml 的范围内，例如在 0.05-2.0mg/mL 的范围内。

可以使用如图 1 说明的过滤系统进行纳滤过程。

可以如以下说明性实例中所示进行该过程：向压力罐(1)中充满注射用水(WFI)，将病毒滤器(3)之前的罐中的压力升高到 3.5 巴，冲洗滤器 10 分钟。将压力降到 2 巴，再冲洗病毒滤器(3) 10 分钟。将压力罐(1)中的注射用水排掉，将液体因子 VII 组合物充入压力罐(1)之前，可选地用缓冲液重复冲洗过程。将压力提高到 2 巴，在过滤中保持基本恒定。随后可以通过标准的步骤检测病毒滤器(3)的完整性。

将滤过物收集于混合罐内，可以对其进行进一步处理以获得包含因子 VIIa 多肽作为药物物质的药物组合物。

据说,通常有利的是在纳滤步骤之前进行预过滤步骤,以去除可能导致纳滤器堵塞的较大颗粒、聚集物等等。这种预过滤器通常具有的孔径大小范围是 0.05-0.5 μm 。在一个实施方案中,该预过滤器是 Millipore NFR 滤器。

使用空气压力的一种替代方式是,置于压力罐后面的液体泵可以提供过滤所需的压力。

如果纳滤后的液体因子 VII 组合物包含无活性的因子 VII 多肽,则随后可以对该组合物进行活化步骤,例如 Bjørn. S. & Thim, L. Res. Disclosures (1986) 269, 564-565, Pedersen, A.H. & al., Biochemistry (1989), 28, 9331-9336, 和 Tomokiyo, K. & al., Vox Sang. 84, 54-64 (2003) 中描述的。

可以如 Jurlander, B. & al., Seminars in Thrombosis and Hemostasis 27, 4, 373-383 (2001) 中所公开的方式对组合物进一步处理和最后配制为药物产品。

无血清的液体因子 VII 多肽组合物的纳滤

本发明的一个不同的方面可能包括以上特性中的一些或者全部,其中涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法,所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽,所述的液体组合物基本上没有血清,所述的方法包括使用孔径大小最大为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤。

一种吸引人的变通方式是其中所述因子 VII 多肽是使用 CHO 细胞,例如在没有任何动物来源成分的培养基中的 CHO 细胞中,通过细胞培养所生产的形式。

本发明的这个方面并不特别限于其中一定量的因子 VII 多肽呈活化形式的液体因子 VII 组合物。但是，以上针对本发明的第一方面所提及的条件也适于这一点，即本发明的第二方面，其中可作必要的修正。

通过特殊的滤器对液体因子 VII 多肽组合物进行纳滤

本发明的另一个不同的方面可能包括以上特征中的一些或者全部，其中涉及从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，所述的方法包含使用孔径大小最大为 80nm 的纳滤器对所述的溶液进行纳滤，所述的纳滤器具有由选自下列的一种或者多种材料制成的膜：铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

在一个实施方案中，所述材料选自基于聚偏二氟乙烯的材料和基于聚醚砜的材料。

本发明的这个方面并不特别限于其中一定量的因子 VII 多肽呈活化形式的液体因子 VII 组合物。但是，以上针对本发明的第一方面所提及的条件也适于这一点，即本发明的第三方面，其中可作必要的修正。

通过加入去污剂使病毒失活

在另一个方面，本发明还涉及使液体因子 VII 组合物中的病毒失活的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，该方法包括将去污剂与所述组合物相组合的步骤。

在一些实施方案中，所述去污剂选自非离子型去污剂，例如那些选自辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、聚山梨酸酯、泊洛沙姆、聚氧乙烯烷基醚、聚乙烯/聚丙烯嵌段共聚物、聚乙二醇 (PEG)、聚氧乙烯硬脂酸

酯以及聚氧乙烯蓖麻油的去污剂。其说明性的实例是非离子型去污剂，例如 Triton X-100, Tween®, 聚山梨酸酯 20, 聚山梨酸酯 60, 聚山梨酸酯 80, Brij-35 (聚氧乙烯十二烷基醚), 泊洛沙姆 188, 泊洛沙姆 407, PEG8000, Pluronic®多元醇, 聚氧基-23-月桂基醚, Myrj 49, 和 Cremophor A。

特别有用的去污剂是具有化学式 $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_2)_2)-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$ 的辛基苯氧基聚乙氧乙醇，其中 n 的范围是 5-15, 特别是其中 n 为 9-10 的化合物, 如去污剂 Triton X-100。

在一个实施方案中，去污剂与液体因子 VII 组合物组合，使去污剂在组合物中的浓度在 0.01-0.5% (重量) 范围内，例如在 0.05-0.4% (重量) 范围内，例如在 0.05-0.3% (重量) 范围内，例如在 0.05-0.2% (重量) 范围内，例如在 0.05-0.1% (重量) 范围内。

在另一个实施方案中，在温度范围为 2-12℃、例如 2-9℃ 范围内将去污剂与组合物组合。

对于大多数的目的，发现包括磷酸三烷基酯去污剂是不合意的，因此所述去污剂可以基本没有磷酸三烷基酯溶剂，例如磷酸三(正丁基)酯。

在一个特定的实施方案中，所述方法包括在 2-9℃ 的温度范围内将因子 VII 多肽组合物与 Triton X-100 相组合至浓度为 0.05-0.2% (重量) 的步骤，前提条件是所述去污剂基本没有磷酸三烷基酯溶剂，例如磷酸三(正丁基)酯。

本发明的这个方面并不特别限于其中一定量的因子 VII 多肽呈活

化形式的液体因子 VII 组合物。但是，以上针对本发明的第一方面所提及的条件也适于这一点，即本发明的第四方面，其中可作必要的修正。

病毒灭活步骤的组合

在另一个方面，本发明涉及从液体因子 VII 组合物中高水平地消除活性病毒存在的方法，该方法包括如下步骤：(i)使用“通过加入去污剂使病毒失活”标题下的方法灭活病毒，和(ii)使用在“纳滤”标题下定义的任何方法除去病毒的步骤，这些步骤可以是任何顺序。

在一个实施方案中，灭活病毒的步骤在去除病毒的步骤之前。

即使认为单个步骤对于去除活性病毒的存在这个目的是足够的，但可以认为这两种方法至少部分地“不相关”，因为某些病毒可能使用其中一种方法较难去除，而相同的这些病毒使用另外一种方法可以更容易地去除，反之亦然。因此，这两种方法的组合会为旨在应用因子 VII 多肽的患者提供更加高水平的安全性，而绝非为了开具因子 VII 多肽药物处方的医生以及批准该药物的监管当局。因此，这两种方法的组合可能具有较高的商业价值。

如上所述，本发明涉及去除病毒颗粒或者使其失活。在特定的工艺步骤中病毒颗粒量的减少通常以 $\log$ 单位描述 ($\log_{10}$ 对数，或者 $\log_2$)，其中减少系数以该步骤之后病毒颗粒的量与该步骤之前病毒颗粒的量之比计算。

例如，如果在该步骤前病毒颗粒是 10^6 ，而在该步骤后是 10^2 ，则减少系数是 10^4 ，或者 $4 \log_{10}$ 。

从整个工艺中病毒颗粒的总减少量以相同的方式描述，并且可以

通过将该工艺中每一步骤的病毒清除加在一起进行计算，词语“清除”指的是病毒的去除以及病毒的灭活二者。

对于有效的特定病毒清除步骤而言，优选地病毒减少至少 $4\log_{10}$ 。

在本发明的一个实施方案中，过滤步骤使病毒颗粒的量至少降低了大约 $4\log_{10}$ 。在本发明的一个实施方案中，过滤步骤使病毒颗粒的量至少降低了大约 $5\log_{10}$ 。

在本发明的一个实施方案中，所述 FVII 组合物与去污剂相组合的步骤使至少大约 $4\log_{10}$ 的病毒灭活。在本发明的一个实施方案中，所述 FVII 组合物与去污剂相组合的步骤使至少大约 $5\log_{10}$ 的病毒灭活。

病毒颗粒量的确定对于本领域内的技术人员是已知的，并且可以通过标准的 $TCID_{50}$ 检测法（半数终点值的组织培养感染量每毫升（Tissue culture infectious dose 50% endpoint per ml））、噬斑检测法或者 PCR 检测法进行测定。 $TCID_{50}$ 检测法和噬斑检测法可以用于测定感染性颗粒的浓度，而 PCR 检测法可以用于测定感染性和非感染性的被灭活病毒颗粒二者。

本发明的实施方案

1. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法，所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽，所述的一种或者多种因子 VII 多肽中至少 5% 是以活化形式存在的，所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤。

2. 根据实施方案 1 的方法，其中所述一种或者多种因子 VII 多肽中至少 7%，例如至少 10% 是以活化形式存在的。

3. 根据实施方案 1 的方法，其中因子 VII 多肽的活化形式占所述

一种或者多种因子 VII 多肽质量的 5-70%，例如 7-40%，如 10-30%。

4. 根据实施方案 1 的方法，其中因子 VII 多肽的活化形式占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 50-100%，例如 70-100%，如 80-100%。

5. 根据实施方案 1 的方法，其中因子 VII 多肽的活化形式占所述一种或者多种因子 VII 多肽质量的 20-80%，例如 30-70%，如 30-60%。

6. 根据前面任何实施方案的方法，其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内，如在 7.6-9.4 的范围内，例如在 7.7-9.3 的范围内，如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。

7. 根据前面任何实施方案的方法，其中在液体组合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内，例如在 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。

8. 根据前面任何实施方案的方法，其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm，如至多 30nm，例如在 10-30nm 范围内。

9. 根据前面任何实施方案的方法，其中所述纳滤器的膜由选自下列的一种或者多种材料制成：铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

10. 根据前面任何实施方案的方法，其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

11. 根据前面任何实施方案的方法，其中所述液体组合物是基本上无血清的。

12. 根据实施方案 1-10 中任何一项的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在牛血清或胎牛血清存在下通过细胞培养产生的。

13. 根据前面任何实施方案的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

14. 根据实施方案 13 的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在没有任何动物来源成分的培养基中, 在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

15. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法, 所述组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽, 所述液体组合物基本没有血清, 所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤。

16. 根据实施方案 15 的方法, 其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

17. 根据实施方案 15 或 16 的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

18. 根据实施方案 17 的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在没有任何动物来源成分的培养基中, 在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

19. 根据实施方案 15-18 中任何一项的方法, 其中所述一种或者多种因子 VII 多肽中的至少 5% 是以活化形式存在的。

20. 根据实施方案 15-19 中任何一项的方法, 其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内, 如在 7.6-9.4 的范围内, 例如在 7.7-9.3 的范围内, 如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。

21. 根据实施方案 15-20 中任何一项的方法, 其中在所述液体组合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内, 例如 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。

22. 根据实施方案 15-21 中任何一项的方法, 其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm, 如至多 30nm, 例如在 10-30nm 范围内。

23. 根据实施方案 15-22 中任何一项的方法, 其中所述纳滤器的膜由选自下列的一种或者多种材料制成: 铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

24. 从液体因子 VII 组合物中去除病毒的方法, 所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽, 所述方法包括使用孔径大小至多为 80nm 的纳滤器对所述溶液进行纳滤, 所述纳滤器具有由选自下列的一种或者多种材料制成的膜: 铜铵再生纤维素、亲水性聚偏二氟乙烯 (PVDF)、复合 PVDF、表面改性 PVDF 和聚醚砜。

25. 根据实施方案 24 的方法, 其中所述材料选自基于聚偏二氟乙烯的材料和基于聚醚砜的材料。

26. 根据实施方案 24-25 中任何一项的方法, 其中所述一种或者多种因子 VII 多肽的至少 5%是以活化形式存在的。

27. 根据实施方案 24-26 中任何一项的方法, 其中所述液体组合物的 pH 在 7.0-9.5 的范围内, 如在 7.6-9.4 的范围内, 例如在 7.7-9.3 的范围内, 如在 8.0-9.0 的范围内或者在 8.3-8.7 的范围内。

28. 根据实施方案 24-27 中任何一项的方法, 其中在所述液体组

合物中因子 VII 多肽的浓度在 0.01-5mg/ml 的范围内, 例如在 0.05-2.0 mg/mL 的范围内。

29. 根据实施方案 24-28 中任何一项的方法, 其中所述纳滤器的孔径大小至多是 50nm, 如至多 30nm, 例如在 10-30nm 范围内。

30. 根据实施方案 24-29 中任何一项的方法, 其中所述液体因子 VII 组合物源自细胞培养上清液或者从细胞培养上清液获得。

31. 根据实施方案 24-30 中任何一项的方法, 其中所述液体组合物是基本上无血清的。

32. 根据实施方案 24-31 中任何一项的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在牛血清或胎牛血清存在下通过细胞培养产生的。

33. 根据实施方案 24-32 中任何一项的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

34. 根据实施方案 33 的方法, 其中所述因子 VII 多肽是在没有任何动物来源成分的培养基中, 在 CHO 细胞中通过细胞培养产生的。

35. 灭活液体因子 VII 组合物中的病毒的方法, 所述的组合物包含一种或者多种因子 VII 多肽, 该方法包括将所述组合物与去污剂相组合的步骤。

36. 根据实施方案 35 的方法, 其中所述去污剂是具有化学式 $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_3)_2)-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$ 的辛基苯氧基聚乙氧基乙醇, 其中 n 在 5-15 的范围内。

37. 根据实施方案 36 的方法, 其中所述去污剂是 n 为 9-10 的化合物, 例如 Triton X-100.

38. 根据实施方案 35 的方法, 其中所述去污剂选自由下列各项组成的组: Tween®, 聚山梨酸酯 20, 聚山梨酸酯 60, 和聚山梨酸酯 80.

39. 根据实施方案 35-38 中任何一项的方法, 其中所述去污剂与液体因子 VII 组合物相组合, 使得组合物中去污剂的浓度在 0.01-0.3% (重量) 范围内, 例如在 0.05-0.2% (重量) 范围内.

40. 根据实施方案 35-39 中任何一项的方法, 其中将所述去污剂在 2-12°C 的温度范围内、例如 2-9°C 的范围内与所述组合物相组合.

41. 根据实施方案 35-40 中任何一项的方法, 其中所述去污剂基本没有磷酸三烷基酯溶剂, 例如磷酸三(正丁基)酯.

42. 高水平地消除液体因子 VII 组合物中活性病毒的存在的方法, 该方法包括如下步骤: (i) 使用根据实施方案 35-41 中任何一项定义的方法灭活病毒, 和 (ii) 使用根据实施方案 1-35 中任何一项定义的方法去除病毒, 所述步骤可以是任何顺序.

43. 根据实施方案 42 的方法, 其中灭活病毒的步骤在去除病毒的步骤之前.

实施例

实施例 1: 因子 VII 的无血清制备

进行以下实验, 在较大的中试规模培养物中制备因子 VII.

使被编码因子 VII 的质粒转化的 CHO K1 细胞系适合于在无动物来

源成分的培养基中悬浮培养生长。将经过适应后的细胞库冷冻起来。在转瓶内，在无动物来源组分的培养基中通过悬浮培养增殖来自该细胞库的细胞。随着细胞数目的增加，通过加入新的培养基使体积逐渐增加。当体积达到 4L 且细胞数目达到大约 $0.8 \times 10^6/\text{ml}$ 时，将转瓶中的内容物转移到 50L 的搅拌罐反应器（种子反应器）中。随着细胞数目在该 50L 反应器中的增加，通过加入新的培养基使体积逐渐增加。当体积达到 50L 且细胞数目达到大约 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 时，将 50L 反应器中的内容物转移到 500L 的搅拌罐反应器（生产反应器）中。该 500L 反应器含有大孔的 Cytopore 1 载体（Amersham Biosciences），细胞在接种后的 24 小时内被固定在该载体内。随着细胞数目的增加，通过加入新的培养基使 500L 反应器中的体积逐渐增加。当体积达到 450L 且细胞数目达到大约 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 时，开始生产阶段，并且每 24 小时更换一次培养基：停止搅动以使含有细胞的载体沉降，然后收获 80% 的细胞上清液，并换入新的培养基。对收获的培养上清液进行过滤，以除去未捕获的细胞和细胞碎片，然后转移进行进一步的处理。所述 50L 以及 500L 的生物反应器都提供了仪器控制用于控制温度、溶解氧（通过微型喷气装置喷射氧）、搅动速率、顶部空间通气速率和 pH（通过在顶部空间加入 CO_2 向下控制 pH）。此外，所述 500L 生物反应器也提供了仪器控制用于控制溶解的 CO_2 。使用 YSI 8500 CO_2 -仪器进行在线 CO_2 测定。根据 CO_2 信号通过导管向液体中喷射空气，由此控制 CO_2 的水平。如果 CO_2 浓度处于或者低于设定点，则喷气速率设置为 0 L/min 每升培养液体；如果 CO_2 浓度高于设定点，则喷气速率设置为 0.01-0.05 L/min 每升培养液体。溶解 CO_2 的设定点是 160 mmHg。正如所提及的，不在生物反应器中加入碱来控制 pH 的升高。在生产阶段，细胞密度达到 $1-2 \times 10^7$ 细胞/ml，且每天收获物中因子 VII 的浓度是 10-20mg/L。p CO_2 保持在 150-170 mmHg 的范围。即使没有加入碱，pH 也保持在 6.70 以上。

实施例 2：来自捕获步骤的洗脱物的过滤

将要过滤的蛋白质溶液：来自捕获步骤的 25L FVII 溶液，具有以下性质

FVII / FVIIa 的浓度：630 mg/L

FVII 的氧化形式占 1.7 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：未分析

降解：<2.2 %

基本上如本文所述，并参考图 1 进行过滤：

滤器：Millipore NFR, 0.08 m²

压力：2 巴

滤过物的性质：

FVII / FVIIa 的浓度：610 mg/L，即 FVII 的产率：96.8 %

FVII 的氧化形式占 1.5 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：未分析

降解：<2.2 %

实施例 3：来自捕获步骤的洗脱物的过滤

将要过滤的蛋白质溶液：来自捕获步骤的 185mL FVII 溶液，具有以下性质

FVII / FVIIa 的浓度：82 mg/L

FVII 的氧化形式占 3.4 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：19%

降解：<3 %

基本上如本文所述，并参考图 1 进行过滤：

滤器：Pall DV50, 0.0017 m²

压力：2 巴

滤过物的性质：

FVII / FVIIa 的浓度：77,1mg/L，即 FVII 的产率：94%

FVII 的氧化形式占 4.1 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：20%

降解：<3 %

实施例 4：来自捕获步骤的洗脱物的过滤

将要过滤的蛋白质溶液：来自步骤 1 的 108mL 洗脱物，具有以下性质

FVII / FVIIa 的浓度：320 mg/L

FVII 的氧化形式占 3.7 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：3.3%

降解：<0.5 %

基本上如本文所述并参考图 1 进行过滤：

滤器：Asahi Planova 20 N, 0.001 m²

压力：0.8 巴

滤过物的性质：

FVII / FVIIa 的浓度：310mg/L，即 FVII 的产率：100%

FVII 的氧化形式占 3.7 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：未分析

降解：<0.5 %

实施例 5：FVII 批量药物物质的过滤

将要过滤的蛋白质溶液：98ml 的 FVIIa 批量物质，具有以下性质

FVII / FVIIa 的浓度：1460 mg/L

FVII 的氧化形式占 2.1 %

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：>90%

降解：11.9 %

基本上如本文所述并参考图 1 进行过滤：

滤器：Millipore NFP, 0.0017 m²

压力：2 巴

滤过物的性质：

FVII / FVIIa 的浓度：1320mg/L，即 FVII 的产率：90.4%

FVII 的氧化形式占 2.3%

活化程度（即 FVIIa 的百分比）：未分析，因为待过滤的溶液中活化的程度是 98%

降解：12.3 %

实施例 6 病毒去除

来自捕获步骤、包含小鼠白血病病毒、滴度为 YY 噬斑形成单位 (pfu) 的 50ml 因子 VII 多肽溶液（参见实施例 1）

基本如本文所述并参考图 1 进行过滤：

滤器：Millipore NFR, yy cm²

压力：YY 巴

滤过物中的病毒滴度：xx pfu

计算出的清除系数：xx

图1

