I867028

(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 I867028 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：109128140 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 08 月 18 日

(51)Int. Cl.： ***C07K14/71 (2006.01)*** ***C07K1/18 (2006.01)***
C07K1/22 (2006.01)

(30)優先權：2020/08/13 美國 63/065,012
2019/12/06 美國 62/944,635

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：圖斯蒂安 安德魯 TUSTIAN, ANDREW (US)；瓦塔克 安奇 VARTAK, ANKIT (US)；達利 湯瑪斯 DALY, THOMAS (US)；派爾斯 艾瑞卡 PYLES, ERICA (US)；帕拉卡爾 尼沙 PALACKAL, NISHA (US)；王順海 WANG, SHUNHAI (CN)；李 寧 LI, NING (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

WO 2017/168296A1

審查人員：周浩宇

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：59 共 324 頁

(54)名稱

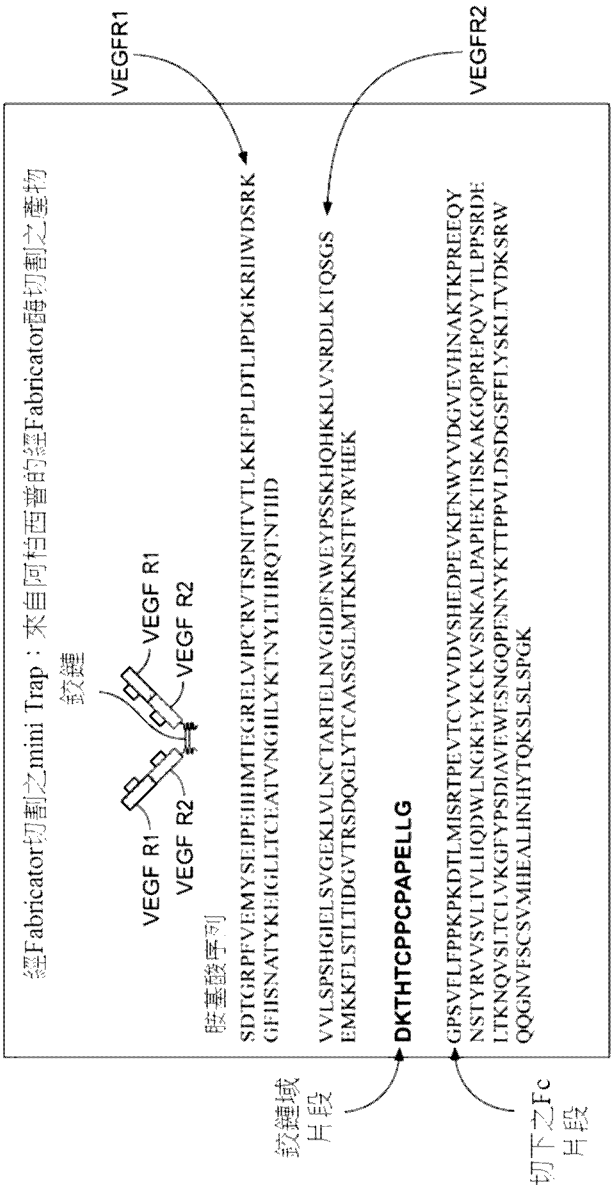
抗ＶＥＧＦ蛋白組合物及其製備方法

(57)摘要

本揭露係關於包含抗 VEGF 蛋白之組合物及用於產生此等組合物之方法。

The present disclosure pertains to compositions comprising anti-VEGF proteins and methods for producing such compositions.

指定代表圖：


VEGFR1
VEGFR2
經Fabricator切割之mini Trap：來自阿柏西普的經Fabricator酶切割之產物
鉸鏈
VEGF R1
VEGF R2
VEGF R1
VEGF R2
胺基酸序列
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK
GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
DKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
鉸鏈域片段
切下之Fc片段

【圖1】

專利案號：109128140

公告本

I867028

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗 VEGF 蛋白組合物及其製備方法

【英文發明名稱】ANTI-VEGF PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING THE SAME

【中文】

本揭露係關於包含抗 VEGF 蛋白之組合物及用於產生此等組合物之方法。

【英文】

The present disclosure pertains to compositions comprising anti-VEGF proteins and methods for producing such compositions.

【指定代表圖】圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗 VEGF 蛋白組合物及其製備方法

【英文發明名稱】ANTI-VEGF PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明一般係關於抗 VEGF 組合物及其製備方法。

交叉引用相關申請案

【0002】 本申請案主張 2020 年 8 月 13 日提申之美國臨時專利申請案號 62/095,012 之優先權及利益，其內容藉由引用整體併入。

【先前技術】

【0003】 基於蛋白質之生物醫藥組合物已成為用於研究、治療眼科疾病、癌症、自體免疫疾病、感染以及其他疾病及病症之重要產品。生物醫藥代表醫藥行業增長最快之產品領域之一。

【0004】 已鑑別出一類對血管內皮細胞具有選擇性的細胞衍生之二聚促分裂原，並將其命名為血管內皮細胞生長因子(VEGF)。

【0005】 持續的血管生成(angiogenesis)可引起或加劇某些疾病，諸如牛皮癬、類風濕性關節炎、血管瘤、血管纖維瘤、糖尿病性視網膜病及新生血管性青光眼。VEGF 活性之抑制劑可用於治療此等疾病及其他 VEGF 誘發之病理性血管生成及血管通透性疾患，諸如腫瘤血管形成(vascularization)。血管生成素及血管內皮生長因子(VEGF)家族之成員為唯一被認為對血管內皮細胞有很大特異性之生長因子。

【0006】 幾種眼部病症與病理性血管生成有關。例如，年齡相關之黃斑變性(AMD)之發展與稱為脈絡膜新生血管形成(CNV)之過程有關。CNV 之滲漏會引起黃斑水腫及黃斑下方積液，從而導致視力喪失。糖尿病性黃斑水腫(DME)為另一種具有血管生成組分之眼部病症。DME 為糖尿病患者中度視力喪失的最普遍原因，並且為糖尿病性視網膜病之常見併發症，糖尿病性視網膜病為一種影響視網膜血管之疾病。當液體滲漏至黃斑中心時，會發生具

有臨床意義之 DME，黃斑為視網膜之光敏部分，負責清晰、直接視力。黃斑中之液體會導致嚴重視力喪失或失明。

【0007】 各種 VEGF 抑制劑，諸如 VEGF trap Eylea (阿柏西普(aflibercept))，已經批准用於治療此等眼部病症。

【發明內容】

【0008】 本發明係關於抗 VEGF 蛋白，其包括作為融合蛋白的 VEGF trap 蛋白阿柏西普(aflibercept)。本發明亦係關於新的抗 VEGF 蛋白，亦即阿柏西普 MiniTrap 或 VEGF MiniTrap (除非另有說明，否則統稱為 MiniTrap)。本文揭示製備此等抗 VEGF 蛋白之方法，包括提供有效率及有效之手段來產生感興趣之蛋白質的產生模式。在一態樣中，本發明係關於化學成分確定之培養基(CDM)用於產生抗 VEGF 蛋白之用途。在一特定態樣中，感興趣之 CDM 係彼等當使用時產生蛋白質樣本者，其中該樣本具有黃棕色且可包含經氧化之種類。在本申請案中，亦進一步揭示阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體以及附隨產生方法。

阿柏西普之產生

【0009】 本揭露描述使用細胞培養基產生阿柏西普。在一實施例中，細胞培養基為化學成分確定之培養基(「CDM」)。經常使用 CDM，因為它為一種不含蛋白質的化學成分確定之配方，不使用動物來源之組分，並且可確定培養基之組成。在另一實施例中，細胞培養基為大豆水解物培養基。

【0010】 在一實施例中，產生重組蛋白之方法包含：(a)提供經基因工程改造以表現感興趣之重組蛋白的宿主細胞；(b)在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中該細胞表現感興趣之重組蛋白；及(c)收穫由該細胞產生之感興趣之重組蛋白的製劑。在一態樣中，感興趣之重組蛋白為抗 VEGF 蛋白。在一具體態樣中，抗 VEGF 蛋白係選自由阿柏西普及重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、阿柏西普 scFv 及其他抗 VEGF 蛋白組成之群。在一較佳態樣中，感興趣之重組蛋白為阿柏西普。

【0011】 在本實施例之一態樣中，阿柏西普在合適的宿主細胞中表現。此等宿主細胞之非限制性實例包括但不限於 CHO、CHO K1、EESYR®、NICE®、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

【0012】 合適的 CDM 包括經杜爾貝寇改質之伊戈爾(DME)培養基、漢氏營養混合物、Excell 培養基及 IS CHO-CD 培養基。熟習此項技術者已知之其他CDM亦涵蓋在本發明之範疇內。在一具體態樣中，合適的CDM為CDM1B (Regeneron)或 Excell 高級培養基(SAFC)。

【0013】 在一實施例中，使來自包含阿柏西普之 CDM 培養物的經澄清之收穫物樣本經歷捕獲層析程序。在一態樣中，捕獲步驟為使用例如蛋白 A 之親和力層析程序。在又一態樣中，親和程序之析出液呈現出某種顏色，例如，析出液可呈現出黃棕色。如在下文更詳細地描述，顏色可使用以下手段來評估：(i)歐洲顏色標準「BY」，其中進行定性目視檢查；或(ii)比色檢定，CIE L*, a*, b* (或 CIELAB)，其比 BY 系統更具量化性。然而，無論哪種情況，皆應針對蛋白質濃度將多個樣本之間的顏色評估進行歸一化，以確保有意義之評估。例如，參看以下實例 9，蛋白 A 析出液具有約 2.52 之「b*」值，相當於大約 BY5 之 BY 值(於蛋白 A 析出液中以 5 g/L 之蛋白質濃度量測)。若要將蛋白 A 析出液之顏色與另一樣本進行比較，則應針對相同蛋白質濃度進行比較。CIELAB 顏色空間之 b*值用於表示樣本之著色，並覆蓋藍色(-)至黃色(+)。樣本之 b*值比另一樣本越高，表明樣本中之黃棕色著色比另一樣本越強。

【0014】 在一實施例中，使用 CDM 由經基因工程改造以表現阿柏西普之宿主細胞產生阿柏西普。在一態樣中，亦產生阿柏西普之其他種類或變異體。此等變異體包括包含一或多個經氧化胺基酸殘基之阿柏西普同功型，統稱為側氧基變異體(oxo-variant)。使用包含阿柏西普及其側氧基變異體之 CDM 產生的經澄清之收穫物樣本可經歷捕獲層析程序。在一態樣中，捕獲步驟為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序。當使用例如液相層析-質譜法(LC-MS)分析自親和析出液中提取之樣本(其可顯示或不顯示黃棕色)時，可偵測到阿柏西普之一或多種經氧化變異體。顯示經修飾之阿柏西普之某些胺基酸殘基經氧化，包括但不限於組胺酸及/或色胺酸殘基。在一態樣中，變異體可包括一或多個甲硫胺酸殘基以及其他殘基之氧化，參見下文。

【0015】 在另一態樣中，變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成N-甲醯基犬尿胺酸。在又一態樣中，變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧

化以形成單羥基色胺酸。在一具體態樣中，蛋白質變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成二羥基色胺酸。在一具體態樣中，蛋白質變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成三羥基色胺酸。

【0016】　在另一態樣中，變異體可包括一或多個選自由以下組成之群組的修飾：例如，一或多個天冬醯胺之脫醯胺；一或多個天冬胺酸轉化為異天冬胺酸及/或 Asn；一或多個甲硫胺酸之氧化；一或多個色胺酸氧化為 N-甲醯基犬尿胺酸；一或多個色胺酸氧化為單羥基色胺酸；一或多個色胺酸氧化為二羥基色胺酸;一或多個色胺酸氧化為三羥基色胺酸;一或多個精胺酸之 Arg 3-去氧葡醛酮糖化(deoxyglucosonation)；C 端甘胺酸之移除；以及一或多個非醣化糖位點(non-glycosylated glycosite)之存在。

【0017】　在另一實施例中，本發明係關於用於產生阿柏西普之方法。在一態樣中，包含阿柏西普及其變異體的經澄清之收穫物樣本經歷捕獲步驟，諸如蛋白 A 親和力層析。在親和步驟之後，親和析出液可經歷離子交換層析。離子交換層析可為陽離子交換層析或陰離子交換層析。混合模式或多模式層析以及其他層析程序亦涵蓋在本實施例之範疇內，下面將進一步討論。在一具體態樣中，離子交換層析為陰離子交換層析(AEX)。採用 AEX 之合適條件包括但不限於 pH 值為約 8.3 至約 8.6 之 Tris 鹽酸鹽。在使用例如 pH 值為約 8.3 至約 8.6 之 Tris 鹽酸鹽進行平衡後，將樣本加載至 AEX 管柱上。加載管柱後，可使用例如平衡緩衝液將管柱洗滌一次或多次。在一具體態樣中，所用條件可促進阿柏西普及其經氧化變異體之差異層析性能，使得可在流通級分中收集包含阿柏西普而無顯著量之側氧基變異體的級分，同時顯著部分之側氧基變異體保留在 AEX 管柱之固相上，並且可在汽提管柱後獲得– 參見以下實例 2，**圖 11**。參看**圖 11** 及實例 2，可在不同產生步驟之間觀察到側氧基變異體之變化。例如，可藉由「色胺酸氧化水準(%)」部分(特別是「W138(+16)」管柱)中之數據來說明此變化。可觀察到，在 AEX 層析(AEX 分離 2)後，側氧基變異體(具體而言，側氧色胺酸)自加載樣本中之約 0.131% 變為流通樣本中之約 0.070%，表明使用 AEX 減少阿柏西普之側氧基變異體。

【0018】　可使用離子交換來減弱或最小化顏色。在本實施例之一態樣中，使經澄清之收穫物樣本經歷捕獲層析，例如使用蛋白 A 親和力層析。親和力

管柱經溶析，並具有第一顏色，該顏色具有為其賦予之特定 BY 及/或 b*值。此蛋白 A 析出液接著經歷離子交換層析，諸如陰離子交換層析(AEX)。洗滌離子交換管柱，並收集流通液，該流通液具有第二顏色，該顏色具有為其賦予之特定 BY 及/或 b*值。在一具體態樣中，第一顏色之顏色值(「BY」或「b*」)與第二顏色之顏色值不同。在又一態樣中，如由個別 BY 及/或 b*值所反映，與 AEX 流通液之第二顏色相比，蛋白 A 析出液之第一顏色具有更黃棕色之顏色。通常，與蛋白 A 析出液之第一顏色相比，AEX 之後的第二顏色之黃棕色減弱。例如，使用陰離子交換將蛋白 A 析出液樣本中觀察到之黃棕色自約 3.06 之 b*值(第一顏色)減弱至 AEX 之後的約 0.96 (第二顏色)– 參見以下實例 2，**表 2-3**。

【0019】 在實施例之一態樣中，用於 AEX 管柱之平衡緩衝液及洗滌緩衝液之 pH 值均可為約 8.30 至約 8.60。在另一態樣中，用於 AEX 管柱之平衡緩衝液及洗滌緩衝液之電導率均可為約 1.50 至約 3.00 mS/cm。

【0020】 在實施例之一態樣中，平衡緩衝液及洗滌緩衝液可為約 50 mM Tris 鹽酸鹽。在一態樣中，汽提緩衝液包含 2M 氯化鈉或 1N 氫氧化鈉或兩者(參見**表 2-2**)。

【0021】 本實施例可包括不以特定順序添加一或多個步驟，諸如疏水性相互作用層析(HIC)、親和力層析、多模式層析、病毒失活化(例如，使用低 pH 值)、病毒過濾及/或超濾/滲濾以及其他熟知之層析步驟。

【0022】 在一實施例中，抗 VEGF 蛋白在一或多個天冬醯胺處如下經醣化：G0-GlcNAc 醣化；G1-GlcNAc 醣化；G1S-GlcNAc 醣化；G0 醣化；G1 醣化；G1S 醣化；G2 醣化；G2S 醣化；G2S2 醣化；G0F 醣化；G2F2S 醣化；G2F2S2 醣化；G1F 醣化；G1FS 醣化；G2F 醣化；G2FS 醣化；G2FS2 醣化；G3FS 醣化；G3FS3 醣化；G0-2GlcNAc 醣化；Man4 醣化；Man4_A1G1 醣化；Man4_A1G1S1 醣化；Man5 醣化；Man5_A1G1 醣化；Man5_A1G1S1 醣化；Man6 醣化；Man6_G0+磷酸醣化；Man6+磷酸醣化；及/或 Man7 醣化。在一態樣中，抗 VEGF 蛋白可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。

【0023】 在一態樣中，抗 VEGF 蛋白之組合物之醣化譜如下：約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 6%至約 15%甘

露糖-5 及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣(參見實例 6)。在一態樣中，抗 VEGF 蛋白在約 32.4%天冬醯胺 123 殘基及/或約 27.1%天冬醯胺 196 殘基處具有 Man5 醣化。

【0024】 在一實施例中，該方法可進一步包含使用醫藥學上可接受之賦形劑調配原料藥。在實施例之一態樣中，醫藥學上可接受之賦形劑可選自以下：水、緩沖劑、糖、鹽、界面活性劑、胺基酸、多元醇、螯合劑、乳化劑及防腐劑。熟習此項技術者熟知之其他賦形劑在此實施例之範圍內。

【0025】 在實施例之一態樣中，調配物可適於向人類個體投與。具體而言，可藉由玻璃體內注射實現投與。在一態樣中，調配物可具有約 40 至約 200 mg/mL 感興趣之蛋白質。

【0026】 調配物可用作治療或預防血管生成性眼部病症之方法，該等病症可包括：年齡相關之黃斑變性(例如，濕性或乾性)、黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞後之黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞(RVO)、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、視網膜分支靜脈阻塞(BRVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)、脈絡膜新生血管形成(CNV)、虹膜新生血管形成、新生血管性青光眼、青光眼手術後纖維化、增生性玻璃體視網膜病(PVR)、視盤新生血管形成、角膜新生血管形成、視網膜新生血管形成、玻璃體新生血管形成、角膜翳、翼狀胬肉、血管性視網膜病、在患有糖尿病性黃斑水腫之個體中的糖尿病性視網膜病；或糖尿病性視網膜病(例如非增生性糖尿病性視網膜病(例如，以約 47 或 53 之糖尿病性視網膜病嚴重程度量表(DRSS)分級為特徵)，或增生性糖尿病性視網膜病；例如，在不患有 DME 之個體中)。

VEGF MiniTrap 之產生

【0027】 本揭露描述阿柏西普之修飾形式之產生，其中 Fc 部分經移除或不存在，且係稱為阿柏西普 MiniTrap 或 VEGF MiniTrap。此 MiniTrap 可在包括化學成分確定之培養基(CDM)或大豆水解物培養基的細胞培養基中產生。

【0028】 在一實施例中，使用 CDM 產生 MiniTrap。在 MiniTrap 產生之一態樣中，使用合適的宿主且在合適的條件下產生全長阿柏西普，並進一步加工從而藉由酶促移除 Fc 部分產生 MiniTrap。替代地，可使用合適的宿主細

胞在合適的條件下產生編碼 MiniTrap 之基因(例如，編碼缺少其 Fc 部分之阿柏西普的核苷酸序列)。

【0029】 在一實施例中，用於製造 MiniTrap 之方法包括產生全長阿柏西普融合蛋白，繼之切割 Fc 區。在一態樣中，方法涉及產生重組蛋白，亦即全長阿柏西普融合蛋白(參見美國專利第 7,279,159 號，其全部教導以引用方式併入本文)，包含：(a)提供經基因工程改造以表現全長阿柏西普之宿主細胞；(b)在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中細胞表現全長阿柏西普；(c)收穫由細胞產生之全長阿柏西普的製劑；及(d)對全長阿柏西普進行酶切割，該酶切割對移除融合蛋白之 Fc 部分具有特異性。在另一態樣中，在熟習此項技術者熟知之合適條件下，由合適的宿主細胞表現編碼阿柏西普減去其 Fc 部分之核苷酸序列(*參見*美國專利第 7,279,159 號)。

【0030】 在本實施例之一態樣中，阿柏西普在合適的宿主細胞中表現。此等宿主細胞之非限制性實例包括但不限於 CHO、CHO K1、EESYR®、NICE®、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

【0031】 合適的 CDM 包括經杜爾貝寇改質之伊戈爾(DME)培養基、漢氏營養混合物、EX-CELL 培養基(SAFC)及 IS CHO-CD 培養基(Irvine)。熟習此項技術者已知之其他 CDM 亦涵蓋在本發明之範疇內。在一具體態樣中，合適的 CDM 為 CDM1B (Regeneron)或 Excell 培養基(SAFC)。

【0032】 在一態樣中，在產生 MiniTrap 期間，包含感興趣之蛋白質(亦即，阿柏西普融合蛋白及/或 MiniTrap)及其變異體(包括側氧基變異體)的樣本可顯示某些顏色特性-黃棕色。例如，來自親和力層析步驟之析出液樣本可顯示使用 BY 及/或 b*系統量測之某種黃棕色(參見以下實例 2 及 9)。「樣本」之例示性來源可包括親和力層析，諸如蛋白 A 析出液；樣本可自離子交換層析之流通級分獲得；其亦可自離子交換管柱之汽提獲得-在產生過程中存在熟習此項技術者熟知的可由此分析樣本之其他來源。如上所提及且在下文中進一步描述，顏色可使用以下手段來評估：(i)歐洲顏色標準「BY」，其中進行定性目視檢查；或(ii)比色檢定，CIELAB，其比 BY 系統更具量化性。然而，無論哪種情況，皆應例如使用蛋白質濃度將多個樣本之間的顏色評估進行歸一化，以確保樣本之間有意義的評估。

【0033】 在本實施例之一態樣中，可例如使用採用蛋白酶或其酶活性變異體之蛋白水解消化對全長阿柏西普融合蛋白進行酶處理(「切割活性」)以產生 VEGF MiniTrap。在此實施例之一態樣中，蛋白酶可為釀膿鏈球菌(Streptococcus pyogenes)之免疫球蛋白降解酶(IdeS)。在另一態樣中，蛋白酶可為凝血酶胰蛋白酶、胞內蛋白酶 Arg-C、胞內蛋白酶 Asp-N、胞內蛋白酶 Glu-C、外膜蛋白酶 T (OmpT)、IdeS、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、木瓜蛋白酶、鏈黴蛋白酶或來自齋藤麴菌(Aspergillus Saitoi)之蛋白酶。在一態樣中，蛋白酶可為半胱胺酸蛋白酶。在實施例之一具體態樣中，蛋白酶可為 IdeS。在另一態樣中，蛋白酶可為 IdeS 之變異體。IdeS 變異體之非限制性實例在下文中描述，並且包括具有由以下組成之群組中列出之胺基酸序列的多肽：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一態樣中，蛋白酶可固定在瓊脂糖或另一種合適的基質上。

【0034】 在一態樣中，使用 CDM 產生感興趣之蛋白質(連同其變異體)。在一具體態樣中，感興趣之蛋白質包括阿柏西普或 MiniTrap。變異體包含一或多個經氧化之胺基酸殘基，統稱為側氧基變異體。經氧化殘基之實例包括但不限於一或多個組胺酸及/或色胺酸殘基，亦已使用 LC-MS 偵測到其他經氧化殘基並且在下文中描述，諸如經氧化之甲硫胺酸。後續層析諸如 AEX 可用於將給定樣本中之此等側氧基變異體與感興趣之蛋白質分離，並且在本文中描述。

【0035】 在一態樣中，變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成 N-甲醯基犬尿胺酸。在又一態樣中，變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成單羥基色胺酸。在一具體態樣中，蛋白質變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成二羥基色胺酸。在一具體態樣中，蛋白質變異體可包括一或多個色胺酸殘基之氧化以形成三羥基色胺酸。

【0036】 在另一態樣中，側氧基變異體可包括一或多種選自由以下組成之群組的修飾：一或多個天冬醯胺殘基之脫醯胺；一或多個天冬胺酸轉化為異

天冬胺酸及/或 Asn；一或多個甲硫胺酸殘基之氧化；一或多個色胺酸殘基之氧化以形成 N-甲醯基犬尿胺酸；一或多個色胺酸殘基之氧化以形成單羥基色胺酸；一或多個色胺酸殘基之氧化以形成二羥基色胺酸；一或多個色胺酸殘基之氧化以形成三羥基色胺酸；一或多個精胺酸殘基之 Arg 3-去氧葡醛酮糖化；C 端甘胺酸之移除；以及一或多個非醣化糖位點之存在。

【0037】 在一實施例中，製造 MiniTrap 蛋白之方法包含(a)在第一層析平台上捕獲全長阿柏西普融合蛋白，及(b)切割阿柏西普，從而形成 MiniTrap 蛋白，*亦即*缺少其 Fc 域之阿柏西普。在一態樣中，第一層析載體包含親和力層析介質、離子交換層析介質或疏水性相互作用層析介質。在一具體態樣中，第一層析平台包含親和力層析平台，諸如蛋白 A。在又一態樣中，將捕獲步驟(a)之蛋白質自第一層析平台中溶析出，之後為切割步驟(b)。在仍又一態樣中，切割步驟(b)之後為第二捕獲步驟。在一具體態樣中，此第二捕獲步驟可藉由親和力層析諸如蛋白 A 親和力層析來促進。此第二捕獲步驟之流通液(包含 MiniTrap)具有第一顏色，例如黃棕色，並且經量測具有特定的 BY 及/或 b*值– *參見例如*以下實例 9。另外，此第二捕獲流通液之 LC-MS 分析可證明存在側氧基變異體，其中 MiniTrap 之一或多個殘基經氧化(參見以下實例 9)。

【0038】 在又一態樣中，第二捕獲流通液可經歷離子交換層析，諸如 AEX。可使用合適的緩衝液洗滌此 AEX 管柱，並且可收集基本上包含 MiniTrap 之 AEX 流通級分。此 AEX 流通級分可具有第二顏色，該顏色具有黃棕色著色，具有特定的 BY 及/或 b*值。在又一態樣中，如藉由 BY 及/或 b*系統所量測，第一顏色(來自第二捕獲步驟之流通液)與第二顏色(離子交換程序之流通液)具有不同顏色。在一態樣中，與第一顏色相比，在 AEX 之後，使用 BY 及/或 b*值測得之第二顏色顯示出減弱的黃棕色。

【0039】 在另一實施例中，步驟(b)之切割活性可使用層析管柱進行，其中將切割活性，例如酶活性附著或固定在管柱基質上。步驟(b)中使用之管柱可包含一或多種已經提到且在下文更充分描述之蛋白酶。

【0040】 在一實施例中，離子交換層析程序可包含陰離子交換(AEX)層析介質。在另一態樣中，離子交換層析介質包含陽離子交換(CEX)層析介質。

採用 AEX 之合適條件包括但不限於 pH 值為約 8.3 至約 8.6 之 Tris 鹽酸鹽。在使用例如 pH 值為約 8.3 至約 8.6 之 Tris 鹽酸鹽進行平衡後，將樣本加載至 AEX 管柱上。加載管柱後，可使用例如平衡緩衝液將管柱洗滌一次或多次。在一具體態樣中，所用條件可促進使用 AEX 的 MiniTrap 及其側氧基變異體之差異層析性能，從而使 MiniTrap 實質上位於流通級分中，而側氧基變異體則實質上保留在 AEX 管柱上並可藉由汽提管柱而收集(參見以下實例 9)。

【0041】 在一實例中，分析來自不同產生階段之樣本的顏色及側氧基變異體之存在。參看實例 9，親和力流通池(來自第二蛋白 A 親和步驟之流通液)具有約 1.58 之第一 b*值(參見**表 9-3**)。使此第二親和力流通液經歷 AEX。AEX 流通液具有約 0.50 之第二 b*值，表明使用 AEX 後黃棕色顯著減弱。AEX 管柱之汽提產生汽提樣本並且觀察到約 6.10 之第三 b*值，表明與加載液或流通液相比，此汽提樣本具有更黃棕色之顏色。

【0042】 再次參看實例 9，亦進行側氧基變異體分析。所分析之樣本為親和力流通池(第二蛋白 A 親和析出液)、AEX 流通液及 AEX 汽提液。參看**表 9-5** 及**表 9-6**，可在不同產生步驟之間觀察到側氧基變異體之變化。例如，可藉由「色胺酸氧化水準(%)」部分(特別是「W58(+16)」管柱)中之數據來說明此變化。可觀察到，在 AEX 層析之後，側氧基變異體(特別是側氧色胺酸)自加載樣本中之約 0.055%變為流通樣本中之約 0.038%，表明在 AEX 之後側氧變異性減少。分析 AEX 汽提液，並且發現側氧色胺酸種類之百分比為約 0.089%。當將此汽提值與加載液(以及流通液)進行比較時，似乎此側氧基變異體之很大一部分保留在 AEX 管柱上。

【0043】 本實施例可包括不以特定順序添加一或多個步驟，諸如疏水性相互作用層析、親和力層析、多模式層析、病毒失活化(例如，使用低 pH 值)、病毒過濾及/或超濾/滲濾。

【0044】 本發明之一實施例係關於一種再生包含樹脂之層析管柱的方法。在實施例之一態樣中，樹脂具有固定之水解劑。在實施例之又另一態樣中，樹脂包含固定之蛋白酶。在實施例之仍另一態樣中，樹脂為 FabRICATOR® 樹脂或該樹脂之突變體。在實施例之一態樣中，再生包含樹脂之管柱的方法提高樹脂之反應效率。

【0045】 在實施例之一態樣中，再生包含樹脂之管柱的方法包括將管柱樹脂與乙酸一起培育。在一態樣中，所用乙酸之濃度為約 0.1 M 至約 2 M。在一態樣中，乙酸濃度為約 0.5 M。在一態樣中，將樹脂培育至少約 10 分鐘。在另一態樣中，將樹脂培育至少約 30 分鐘。在此實施例之仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 50 分鐘。在此實施例之仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 100 分鐘。在此實施例之仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 200 分鐘。在此實施例之仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 300 分鐘。

【0046】 視情況，將管柱樹脂進一步與胍鹽酸鹽(Gu-HCl)一起培育。在一態樣中，使用不含乙酸之 Gu-HCl 再生管柱樹脂。所用 Gu-HCl 之濃度為約 1 N 至約 10 N。在另一態樣中，Gu-HCl 之濃度為約 6 N。在又一態樣中，管柱樹脂可與再生劑(乙酸、Gu-HCl)一起培育至少約 10 分鐘。在仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 30 分鐘。在仍另一態樣中，將樹脂培育至少約 50 分鐘。在仍另一態樣中，將該樹脂培育至少約 100 分鐘。

【0047】 在一實施例中，將包含樹脂之管柱儲存在乙醇中。在一態樣中，將管柱儲存在乙醇中，其中乙醇百分比為約 5% v/v 至約 20% v/v。在一具體態樣中，使用 20% v/v 乙醇儲存管柱。

【0048】 在一實施例中，該方法可進一步包含使用醫藥學上可接受之賦形劑調配 VEGF MiniTrap。在一態樣中，醫藥學上可接受之賦形劑可選自以下：水、緩沖劑、糖、鹽、界面活性劑、胺基酸、多元醇、螯合劑、乳化劑及防腐劑。熟習此項技術者熟知之其他賦形劑在此實施例之範圍內。

【0049】 本發明之調配物適於向人類個體投與。在本實施例之一態樣中，可藉由玻璃體內注射實現投與。在一態樣中，調配物可具有約 40 至約 200 mg/mL 感興趣之蛋白質。在一具體態樣中，感興趣之蛋白質為阿柏西普或阿柏西普 MiniTrap。

【0050】 調配物可用於治療或預防血管生成性眼部病症之方法中，該等病症可包括：年齡相關之黃斑變性(例如，濕性或乾性)、黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞後之黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞(RVO)、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、視網膜分支靜脈阻塞(BRVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)、脈絡膜新生血管形成(CNV)、虹膜新生血管形成、新生血管性青光眼、青光眼手術

後纖維化、增生性玻璃體視網膜病(PVR)、視盤新生血管形成、角膜新生血管形成、視網膜新生血管形成、玻璃體新生血管形成、角膜翳、翼狀胬肉、血管性視網膜病、在患有糖尿病性黃斑水腫之個體中的糖尿病性視網膜病；或糖尿病性視網膜病(例如非增生性糖尿病性視網膜病(例如，以約 47 或 53 之糖尿病性視網膜病嚴重程度量表(DRSS)分級為特徵)，或增生性糖尿病性視網膜病；例如，在不患有 DME 之個體中)。

IdeS 之變異體

【0051】 本揭露描述 IdeS (FabRICATOR) (SEQ ID NO.: 1)或作為 IdeS 變異體(SEQ ID NO.: 2 至 16)之其他多肽在產生 VEGF MiniTrap 中的用途。IdeS (SEQ ID NO.: 1)在位置 87、130、182 及/或 274 處包括天冬醯胺殘基(在以下 SEQ ID NO.: 1 中展示為粗體且斜體的「***N****」)。此等位置處之天冬醯胺可突變為除天冬醯胺以外之胺基酸，以形成 IdeS 變異體(且突變胺基酸展示為斜體且加下劃線之胺基酸)：

SEQ ID NO.: 1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGP
TPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELT
EGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIG
MKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 2

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG

KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMK
KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 3
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMK
KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 4
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPT
PVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTE
GKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGM
KKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 5
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFN*GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFN*GEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFIN*GYRLSLTNHGP
TPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELT
EGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDGNLKAIYVTDSDSNASIGM
KKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 6

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFDGKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFIN*GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGK
ALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSN*GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 7

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMK
KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 8

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 9

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMK
KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 10

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 11

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPT
PVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTE
GKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMK
KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 12

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT

AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGK
ALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 13
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGK
ALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKY
FVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 14
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 15
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAA
TAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKN
HQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTP

VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEG
KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKK
YFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 16
MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTS
VWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAAT
AGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***GEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGK
ALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKY
FVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

【0052】 在一實施例中，多肽具有經分離之胺基酸序列，其在經分離之胺基酸序列之全長上與由以下組成之群組中列出的具有至少 70%序列一致性：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 80%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 90%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有約 100%序列一致性。在一態樣中，多肽能夠將靶蛋白切割成片段。在一具體態樣中，靶蛋白為 IgG。在另一態樣中，靶蛋白為融合蛋白。在又另一態樣中，片段可包含 Fab 片段及/或 Fc 片段。

【0053】 SEQ ID 1, NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。

【0054】　本揭露亦包括經分離之核酸分子，其編碼具有經分離之胺基酸序列的多肽，該胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上與由以下組成之群組中列出的具有至少 70%序列一致性：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 80%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 90%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有約 100%序列一致性。在一態樣中，多肽能夠將靶蛋白切割成片段。在一具體態樣中，靶蛋白為 IgG。在另一具體態樣中，靶蛋白為融合蛋白。在仍另一具體態樣中，片段可包含 Fab 片段及/或 Fc 片段。

【0055】　本揭露亦包括一種載體，該載體包含編碼具有經分離之胺基酸序列的多肽之核酸，該胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上與由以下組成之群組中列出的具有至少 70%序列一致性：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一態樣中，核酸分子與表現控制序列可操作地連接，該表現控制序列能夠指導其在宿主細胞中之表現。在一態樣中，載體可為質體。在一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 80%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有至少約 90%序列一致性。在另一態樣中，經分離之胺基酸序列在經分離之胺基酸序列之全長上具有約 100%序列一致性。在一態樣中，多肽能夠將靶蛋白切割成片段。在一具體態樣中，靶蛋白為 IgG。在另一態樣中，靶蛋白為融合蛋白。在又另一態樣中，片段可包含 Fab 片段及/或 Fc 片段。

【0056】　在一實施例中，經分離之胺基酸可包含由 SEQ ID NO.: 1 定義之親本胺基酸序列，其在位置 87、130、182 及/或 274 處的天冬醯胺殘基突變

為除天冬醯胺以外之胺基酸。在一態樣中，與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高。在另一態樣中，與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高 50%。在一態樣中，胺基酸可選自天冬胺酸、白胺酸及精胺酸。在一具體態樣中，位置 87 處之天冬醯胺殘基突變為天冬胺酸殘基。在另一態樣中，位置 130 處之天冬醯胺殘基突變為精胺酸殘基。在仍另一態樣中，位置 182 處之天冬醯胺殘基突變為白胺酸殘基。在仍另一態樣中，位置 274 處之天冬醯胺殘基突變為天冬胺酸殘基。在仍另一態樣中，位置 87 及 130 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 87 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 87 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 130 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 130 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 87、130 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 87、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 130、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一態樣中，位置 87、130、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。

【0057】　在一相關實施例中，本揭露包括經分離之核酸分子，其編碼具有經分離之胺基酸序列的多肽，該胺基酸序列包含由 SEQ ID NO.: 1 定義之親本胺基酸序列，其在位置 87、130、182 及/或 274 處的天冬醯胺殘基突變為除天冬醯胺以外之胺基酸-參見上文。與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高。

【0058】　在又一相關實施例中，本揭露包括一種載體，其包含編碼具有經分離之胺基酸序列之多肽的核酸分子，該胺基酸序列包含由 SEQ ID NO.: 1 定義之親本胺基酸序列，其在位置 87、130、182 及/或 274 處的天冬醯胺殘基突變為除天冬醯胺以外之胺基酸-參見上文。與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高。在一態樣中，核酸分子與表現控制序列可操作地連接，該表現控制序列能夠指導其在宿主細胞中之表現。在一態樣中，載體可為質體。

基於親和力之產生

【0059】　本揭露亦提供使用親和力層析在抗 VEGF 蛋白產生期間減少宿主細胞蛋白以及其他不期望有的蛋白及核酸之方法。

【0060】　在一實施例中，產生重組蛋白之方法包含：(a)提供經基因工程改造以表現感興趣之重組蛋白的宿主細胞；(b)在宿主細胞表現感興趣之重組蛋白的合適條件下培養宿主細胞；以及(c)收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白的製劑。在一態樣中，感興趣之重組蛋白為抗 VEGF 蛋白。在一具體態樣中，抗 VEGF 蛋白係選自由以下組成之群：阿柏西普、MiniTrap、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。

【0061】　在本實施例之一態樣中，感興趣之重組蛋白在合適的宿主細胞中表現。合適的宿主細胞之非限制性實例包括但不限於 CHO、CHO K1、EESYR®、NICE®、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

【0062】　在本實施例之一態樣中，感興趣之重組蛋白在 CDM 中培養。合適的 CDM 包括經杜爾貝寇改質之伊戈爾(DME)培養基、漢氏營養混合物、Excell 培養基、IS CHO-CD 培養基及 CDM1B。熟習此項技術者已知之其他 CDM 亦涵蓋在本發明之範疇內。

【0063】　除了感興趣之重組蛋白外，產生製劑亦可包含至少一種污染物，包括一或多種宿主細胞蛋白。該至少一種污染物可源自細胞受質(substrate)、細胞培養物或下游製程。

【0064】　在一實施例中，本發明係關於使用親和力層析自生物樣本產生抗 VEGF 蛋白之方法。在一具體態樣中，本文所揭示之方法可用於將抗 VEGF 蛋白與一或多種宿主細胞蛋白及在抗 VEGF 蛋白之培養產生過程中形成之核酸(*例如* DNA)至少部分地分離。

【0065】　在一態樣中，該方法可包含在合適的條件下對包含抗 VEGF 蛋白及伴隨污染物之生物樣本進行親和力層析。在一具體態樣中，親和力層析可包含能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白(「捕獲」)之材料。該層析材料之非限制性實例包括：蛋白 A、蛋白 G、包含例如能夠結合至抗 VEGF 蛋白之蛋白質的層析材料以及包含 Fc 結合蛋白之層析材料。在一特定態樣中，能夠與抗 VEGF 蛋白結合或相互作用的蛋白質可為抗體、融合蛋白或其

片段。能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白的該材料之非限制性實例描述於實例 7 中。

【0066】 在本實施例之一態樣中，該方法可包含使包含抗 VEGF 蛋白及一或多種宿主細胞蛋白/污染物之生物樣本在合適的條件下進行親和力層析，其中親和力層析固定相包含能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白之蛋白質。在一具體態樣中，蛋白質可為抗體、融合蛋白、scFv 或抗體片段。在一特定態樣中，蛋白質可為 $VEGF_{165}$、$VEGF_{121}$、來自其他物種諸如兔之 VEGF 形式。例如，如**表 7-1** 及**表 7-10** 中所例示，使用 $VEGF_{165}$ 作為能夠選擇性或特異性地與抗 VEGF 蛋白結合或相互作用之蛋白質可成功地產生 MT5 (抗 VEGF 蛋白)、阿柏西普及抗 VEGF scFv 片段。在另一特定態樣中，蛋白質可為一或多種具有如 SEQ ID NO.: 73-80 中所示之胺基酸序列的蛋白質。**表 7-1** 亦揭示使用具有如 SEQ ID NO.: 73-80 中所示之胺基酸序列的蛋白質作為能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白(MT5)之蛋白質成功產生 MT5。

【0067】 在本實施例之一態樣中，該方法可包含使包含抗 VEGF 蛋白及一或多種宿主細胞蛋白/污染物之生物樣本在合適的條件下進行親和力層析，其中親和力層析固定相包含能夠選擇性或特異性地與抗 VEGF 蛋白結合或相互作用之蛋白質，其中抗 VEGF 蛋白可選自阿柏西普、VEGF MiniTrap 或抗 VEGF 抗體。在一具體態樣中，VEGF MiniTrap 可獲自 VEGF 受體組分，進一步，其可藉由在宿主細胞中重組表現 VEGF MiniTrap 而形成。執行該方法可減少樣本中一或多種宿主細胞蛋白之量。例如，**圖 35A** 及**圖 35B** 展示在使用包含以下作為能夠選擇性或特異性地結合至 MT5 之不同蛋白質之五種不同親和力層析管柱時，包含 MT5 (抗 VEGF 蛋白)之樣本中的總宿主細胞蛋白之顯著減少：(i) $VEGF_{165}$ (SEQ ID NO.: 72)；(ii) mAb1 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 73 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 74 為輕鏈)；(iii) mAb2 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 75 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 76 為輕鏈)；(iv) mAb3 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 77 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 78 為輕鏈)以及(v) mAb4 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 79 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 80

為輕鏈)。如**圖 35A** 及**圖 35B** 所見，來自每個基於親和力之產生過程的析出液將宿主細胞蛋白自 7000 ppm 以上分別降至約 25 ppm 及約 55 ppm。

【0068】　使用親和力層析之合適條件可包括但不限於使用平衡緩衝液來平衡親和力層析管柱。在使用例如 pH 值為約 8.3 至約 8.6 之 Tris 鹽酸鹽進行平衡後，將生物樣本加載至親和力層析管柱上。加載管柱後，可使用例如平衡緩衝液(諸如杜爾貝寇磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS))將管柱洗滌一次或多次。在溶析管柱之前，可使用其他洗滌，包括採用不同緩衝液之洗滌。管柱溶析可受到緩衝液類型以及 pH 值及電導率之影響，可採用熟習此項技術者熟知之其他溶析條件。使用一或多種類型之溶析緩衝液(例如，pH 值為約 2.0 至約 3.0 之甘胺酸)進行溶析後，可藉由添加中和緩衝液(例如，pH 7.5 之 1 M Tris)來中和溶析級分。

【0069】　在實施例之一態樣中，洗滌緩衝液及平衡緩衝液之 pH 值均可為約 7.0 至約 8.6。在實施例之一態樣中，洗滌緩衝液可為 DPBS。在一態樣中，溶析緩衝液可包含 100 mM 甘胺酸緩衝液，pH 值為約 2.5。在另一態樣中，溶析緩衝液可為 pH 值為約 2.0 至約 3.0 之緩衝液。在一態樣中，中和緩衝液可包含 1 M tris，pH 值為約 7.5。

【0070】　在本實施例之一態樣中，該方法可進一步包含用洗滌緩衝液洗滌管柱。在本實施例之一態樣中，該方法可進一步包含用溶析緩衝液溶析管柱以獲得溶析級分。在一具體態樣中，與生物樣本中的宿主細胞蛋白之量相比，溶析級分中的宿主細胞蛋白之量顯著減少，例如，減少了約 70%、約 80%、90%、約 95%、約 98%或約 99%。

【0071】　本實施例可包括不以特定順序添加一或多個步驟，諸如疏水性相互作用層析、基於親和力之層析、多模式層析、病毒失活化(例如，使用低 pH 值)、病毒過濾及/或超濾/滲濾。

【0072】　在一態樣中，抗 VEGF 蛋白之組合物之醣化譜如下：約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 6%至約 15%甘露糖-5 及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。

【0073】 在此實施例之一態樣中，抗 VEGF 蛋白在約 32.4%天冬醯胺 123 殘基及/或約 27.1%天冬醯胺 196 殘基上具有 Man5 醣化。在一特定實施例中，抗 VEGF 蛋白可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。

【0074】 在一實施例中，該方法可進一步包含使用醫藥學上可接受之賦形劑調配原料藥。在一態樣中，醫藥學上可接受之賦形劑可選自以下：水、緩沖劑、糖、鹽、界面活性劑、胺基酸、多元醇、螯合劑、乳化劑及防腐劑。熟習此項技術者熟知之其他賦形劑在此實施例之範圍內。

【0075】 在實施例之一態樣中，調配物可適於向人類個體投與。在本實施例之一態樣中，可藉由玻璃體內注射實現投與。在一態樣中，調配物可具有約 40 至約 200 mg/mL 感興趣之蛋白質。在一具體態樣中，感興趣之蛋白質可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。

【0076】 調配物可用於治療或預防血管生成性眼部病症之方法中，該等病症可包括：年齡相關之黃斑變性(例如，濕性或乾性)、黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞後之黃斑水腫、視網膜靜脈阻塞(RVO)、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、視網膜分支靜脈阻塞(BRVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)、脈絡膜新生血管形成(CNV)、虹膜新生血管形成、新生血管性青光眼、青光眼手術後纖維化、增生性玻璃體視網膜病(PVR)、視盤新生血管形成、角膜新生血管形成、視網膜新生血管形成、玻璃體新生血管形成、角膜翳、翼狀胬肉、血管性視網膜病、在患有糖尿病性黃斑水腫之個體中的糖尿病性視網膜病；或糖尿病性視網膜病(例如非增生性糖尿病性視網膜病(例如，以約 47 或 53 之糖尿病性視網膜病嚴重程度量表(DRSS)分級為特徵)或增生性糖尿病性視網膜病；例如，在不患有 DME 之個體中)。

側氧基種類之合成

【0077】 本發明之一實施例係關於一或多種使用光來合成經氧化之蛋白質種類的方法。在本實施例之一態樣中，感興趣之蛋白質為抗 VEGF 蛋白。在一具體態樣中，抗 VEGF 蛋白為阿柏西普。在另一態樣中，抗 VEGF 蛋白為包括重組 VEGF MiniTrap 之 VEGF MiniTrap。在本實施例之又另一態樣中，抗 VEGF 蛋白為單鏈可變片段(scFv)。

【0078】 在本實施例之一態樣中，樣本包含感興趣之蛋白質，例如阿柏西普融合蛋白，具有最少或沒有側氧基變異體。對樣本進行光應力處理以合成阿柏西普之經氧化的種類。在一具體態樣中，藉由使用冷白光對樣本進行光應力處理。在另一具體態樣中，藉由使用紫外光對樣本進行光應力處理。

【0079】 在實施例之一特定態樣中，將包含阿柏西普或另一種抗 VEGF 蛋白之樣本暴露於冷白光約 30 小時至約 300 小時，從而造成經修飾之寡肽增加約 1.5 至約 50 倍。此等肽經酶消化及分析，包含選自由以下組成之群組的一或多者：

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)、EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)、QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)、TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)、TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22)、VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23)、SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65)、TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66)、SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67)、IIW*DSR/RIIW*DSR/IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 28)、TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)、GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69)、KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)、F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32)，其中 H*為經氧化為 2-側氧基-組胺酸之組胺酸，其中 C*為經羧甲基化之半胱胺酸，其中 M*為經氧化之甲硫胺酸，其中 W*為經氧化之色胺酸，其中 Y*為經氧化之酪胺酸，且其中 F*為經氧化之苯丙胺酸。可藉由之前提及之蛋白酶例如胰蛋白酶來進行消化。可使用質譜法來分析寡肽。

【0080】 在實施例之一特定態樣中，將包含阿柏西普或其他抗 VEGF 蛋白之樣本暴露於紫外光約 4 小時至約 40 小時，從而造成經修飾之寡肽產物增加約 1.5 至約 25 倍(在進行消化時獲得)，其中樣本包含一或多種選自由以下組成之群組的經修飾之寡肽：

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)、EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)、QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)、TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)、TNYLTH*R (SEQ ID

NO.: 21)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22)、VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23)、SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65)、TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66)、SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67)、IIW*DSR/RIIW*DSR/IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 28)、TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)、GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69)、KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)、F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32)，其中 H*為經氧化為 2-側氧基-組胺酸之組胺酸，其中 C*為經羧甲基化之半胱胺酸，其中 M*為經氧化之甲硫胺酸，其中 W*為經氧化之色胺酸，其中 Y*為經氧化之酪胺酸，且其中 F*為經氧化之苯丙胺酸。可藉由之前提及之蛋白酶例如胰蛋白酶來進行消化。可使用質譜法來分析寡肽。

最小化黃棕色之方法

【0081】 本揭露提供在 CDM 中產生之阿柏西普、MiniTrap 或其類似物的產生期間減少黃棕色著色之方法。

【0082】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，接著收穫包含感興趣之重組蛋白的製劑。在一態樣中，感興趣之重組蛋白為抗 VEGF 蛋白。在一具體態樣中，抗 VEGF 蛋白係選自由以下組成之群：阿柏西普、MiniTrap、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示，該專利以引用之方式全部併入本文)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。在一態樣中，該方法可產生感興趣之重組蛋白的製劑，其中該製劑之顏色使用歐洲 BY 方法或 CIELAB 方法(b*)來表徵。另外，可使用例如 LC-MS 分析側氧基變異體之存在。

【0083】 在本實施例之一態樣中，減弱條件包括提高或降低一或多種培養基組分(例如，胺基酸、金屬或抗氧化物，包括鹽及前驅體)之累積濃度，其對應於顏色以及阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體的減少。胺基酸之非限制性實例包括丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸。在一具體

態樣中，減少半胱胺酸可有效減弱製劑之黃棕色。半胱胺酸濃度亦可影響側氧基變異體。

【0084】　在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普，以及收穫由細胞產生的感興趣之蛋白質的製劑，其中合適的條件部分係藉由將 CDM 中半胱胺酸之累積濃度降低至小於或等於約 10 mM 而獲得。合適的培養基之實例包括但不限於 CDM1B、Excell 或其類似物。如本文所用，術語「累積量」係指在細胞培養過程中添加至生物反應器中以形成 CDM 的特定組分之總量，包括在培養開始時添加的組分之量(在第 0 天的 CDM)及隨後添加的組分之量。當計算組分之累積量時，亦包括在生物反應器產生之前(亦即，在第 0 天的 CDM 之前)添加至種菌培養物或接種物中的組分之量。累積量不受培養過程中組分隨時間損失(例如，經由代謝或化學降解)之影響。因此，具有相同累積量之組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若在不同時間將組分添加至兩種培養物中(例如，若在一種培養物中，所有組分均在開始時添加，而在另一種培養物中，組分係隨時間之推移而添加)。累積量亦不受培養過程中組分隨時間之原位合成(例如，經由代謝或化學轉化)的影響。因此，具有相同累積量之給定組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若組分係經由生物轉化過程在兩種培養物之一種*中原位*合成。累積量可以例如組分之克數或莫耳數之單位表示。

【0085】　如本文所用，術語「累積濃度」係指組分之累積量除以生產批次開始時生物反應器中液體之體積，包括培養物中使用的任何接種物對起始體積之貢獻。例如，若生物反應器在生產批次開始時包含 2 升細胞培養基，並且在第 0、1、2 及 3 天添加 1 克之組分 X，則第 3 天之後的累積濃度為 2 g/L (亦即 4 克除以 2 升)。若在第 4 天向生物反應器中添加另外一升不含組分 X 之液體，則累積濃度將保持為 2 g/L。若在第 5 天，從生物反應器中損失一些液體(例如，經由蒸發)，則累積濃度將保持為 2 g/L。累積濃度可以例如克/升或莫耳/升之單位表示。

【0086】　在此實施例之一態樣中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白；收穫由細胞產生的蛋

白質之製劑，其中藉由將累積半胱胺酸濃度與累積總胺基酸濃度之比率自約1:10 至 1:29 降至約 1:50 至約 1:30 來獲得合適的條件。

【0087】 在一實施例中，該方法包含(i)在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普，以及(ii)收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中藉由將 CDM 中之鐵累積濃度降至小於約 55.0 μM 來獲得合適的條件。在此實施例之一態樣中，與藉由其中 CDM 中之鐵累積濃度大於約 55.0 μM 的方法獲得之製劑相比，藉由此方法獲得之製劑展示較弱之黃棕色。

【0088】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普。該方法進一步包含收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中藉由將 CDM 中之銅累積濃度降至小於或等於約 0.8 μM 來獲得合適的條件。在此實施例之一態樣中，與藉由其中 CDM 中之銅累積濃度大於約 0.8 μM 的方法獲得之製劑相比，藉由此方法獲得之製劑展示較弱之黃棕色。

【0089】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普；以及收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中藉由將 CDM 中之鎳累積濃度降至小於或等於約 0.40 μM 來獲得合適的條件。在此實施例之一態樣中，與藉由其中 CDM 中之鎳累積濃度大於約 0.40 μM 的方法獲得之製劑相比，藉由此方法獲得之製劑展示較弱之黃棕色。

【0090】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普。該方法進一步包含收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中藉由將 CDM 中之鋅累積濃度降至小於或等於約 56 μM 來獲得合適的條件。在此實施例之一態樣中，與藉由其中 CDM 中之鋅累積濃度大於約 56 μM 的方法獲得之製劑相比，藉由此方法獲得之製劑展示較弱之黃棕色。

【0091】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普。該方法進一步包含收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中藉由在 CDM 中針對

單一抗氧化劑存在累積濃度約 0.001 mM 至約 10 mM 之抗氧化劑及若在該 CDM 中添加多種抗氧化劑則不大於約 30 mM 之累積濃度來獲得合適的條件。在此實施例之一態樣中，與藉由其中在 CDM 中不存在累積濃度小於約 0.01 mM 或大於約 100 mM 之抗氧化劑的方法獲得之製劑相比，藉由此方法獲得之製劑展示較弱之黃棕色。抗氧化劑之非限制性實例可為牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸、硫辛酸、麩胱甘肽、氯化膽鹼、氫皮質酮、維生素 C、維生素 E、螯合劑、過氧化氫酶、S-羧甲基-L-半胱胺酸及其組合。螯合劑之非限制性實例包括金精三羧酸(ATA)、去鐵胺(DFO)、EDTA 及檸檬酸鹽。

【0092】　在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普。該方法進一步包含收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中合適的條件包括具有以下之 CDM：在該 CDM 中小於約 55 μM 之鐵累積濃度；在該 CDM 中小於或等於約 0.8 μM 之銅累積濃度；在該 CDM 中小於或等於約 0.40 μM 之鎳累積濃度；在該 CDM 中小於或等於約 56 μM 之鋅累積濃度；在該 CDM 中小於 10 mM 之半胱胺酸累積濃度；及/或在該 CDM 中對於單一抗氧化劑而言濃度為約 0.001 mM 至約 10 mM 之抗氧化劑及若在該 CDM 中添加多種抗氧化劑，則不大於約 30 mM 之累積濃度。

【0093】　在本實施例之一態樣中，使用合適的條件獲得之製劑造成阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體減少至所需量的阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體(稱為阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體的「目標值」)。在此實施例之又一態樣中，使用合適的條件獲得之製劑造成當包括阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之變異體的蛋白質製劑經歸一化為 5 g/L 或 10 g/L 之濃度時，製劑之顏色減小至所需 b*值或 BY 值(分別稱為「目標 b*值」、「目標 BY 值」)。在本實施例之又一態樣中，目標 b*值(或目標 BY 值)及/或變異體之目標值可在力價增加或不明顯減小之製劑中獲得。

【0094】　當結合以下描述及附圖考慮時，將更好地領會及理解本發明之此等及其他態樣。以下描述雖然指示各種實施例及其許多特定細節，但係藉助於說明而非限制方式給出。可在本發明之範疇內進行許多替代、修改、增加或重新佈置。

【圖式簡單說明】

【0095】 圖 1 描繪使用一例示性實施例產生之 VEGF MiniTrap，其包括 VEGFR1 (SEQ ID NO.: 34)、VEGFR2 (SEQ ID NO.: 36)、鉸鏈域片段(SEQ ID NO.: 60)及自阿柏西普切下之 Fc 片段(SEQ ID NO.: 55)。

【0096】 圖 2 描繪所提出的組胺酸氧化為 2-側氧基-組胺酸(14Da)之機制。

【0097】 圖 3 描繪所提出的組胺酸氧化為 2-側氧基-組胺酸(16Da)之機制。

【0098】 圖 4 描繪所提出的色胺酸氧化為 N-甲醯基犬尿胺酸及犬尿胺酸之機制。

【0099】 圖 5 描繪用於產生阿柏西普之一例示性實施例。

【0100】 圖 6 描繪用於產生 VEGF MiniTrap 之一例示性實施例。

【0101】 圖 7 描繪用於產生阿柏西普之一例示性實施例。

【0102】 圖 8 描繪用於產生 VEGF MiniTrap 之一例示性實施例。

【0103】 圖 9 描繪作為一例示性實施例計算得出的 BY 標準對比所計算之 b*值之圖表。

【0104】 圖 10 描繪為評估來自蛋白酶消化之 AEX 加載液及流通液的寡肽(包括還原及烷化阿柏西普之片段(SEQ ID NO.: 55))中的 2-側氧基-組胺酸及色胺酸之氧化百分比(其中下劃線表示殘基之氧化)而進行的實驗之結果。

【0105】 圖 11 描繪由使用來自蛋白酶消化之 AEX 加載液及流通液的寡肽(包括阿柏西普之片段(SEQ ID NO.: 55))進行的肽作圖分析(其中下劃線表示肽序列中殘基之氧化)所識別的肽之相對豐度。

【0106】 圖 12A 描繪在 350 nm 處 MT4 及 MT1 之吸光度對時間(分鐘)之層析圖的全視圖。

【0107】 圖 12**B** 描繪在 350 nm 處 MT4 及 MT1 (包括 SEQ ID NO.: 21 及 28)之吸光度對時間(16-30 分鐘)之層析圖的展開視圖。

【0108】 圖 12**C** 描繪在 350 nm 處 MT4 及 MT1 (包括 SEQ ID NO.: 17、18、19、20)之吸光度對時間(30-75 分鐘)之層析圖的展開視圖。

【0109】 圖 13 描繪為評估來自已藉由 AEX 層析處理的蛋白酶消化之 MT1 的寡肽及來自已由 AEX 層析汽提的蛋白酶消化之 MT1 的寡肽(包括 SEQ ID

NO.: 17、18、19、20、21、28)中的 2-側氧基-組胺酸(及色胺酸二氧化)百分比而進行的實驗之結果。

【0110】 圖 14 描繪為比較 MT1 之不同產生批次中存在的酸性種類及在進行強陽離子交換(CEX)層析時獲得的酸性級分而進行的實驗之結果，包括 SEQ ID NO.: 17、18、19、20、21、28。

【0111】 圖 15 描繪使用強陽離子交換層析富集細胞培養物收穫物樣本中存在的酸性種類及其他變異體之例示性方法。

【0112】 圖 16 描繪根據一例示性實施例來自進行強陽離子交換層析之級分。

【0113】 圖 17 描繪使用雙重鹽-pH 梯度針對經歷 CEX 之 MT1 產生(在任何生產程序之前，≤BY3)及針對去唾液酸化 MiniTrap (dsMT1)之富集變異體根據一例示性實施例進行的強陽離子交換層析圖。

【0114】 圖 18A 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對未分級分離之親本對照之 3D 層析圖。

【0115】 圖 18B 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 1 (代表實驗之一些拖尾特徵)之 3D 層析圖。

【0116】 圖 18C 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 2 特徵之 3D 層析圖。

【0117】 圖 18D 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 3 特徵之 3D 層析圖。

【0118】 圖 18E 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 4 特徵之 3D 層析圖。

【0119】 圖 18F 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 5 特徵之 3D 層析圖。

【0120】 圖 18G 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 6 特徵之 3D 層析圖。

【0121】 圖 18H 描繪根據一例示性實施例藉由強陽離子交換層析進行的針對 MT1 級分 7 特徵之 3D 層析圖。

【0122】 圖 19 描繪根據用於 MT1 產生之一例示性實施例進行的成像毛細管等電聚焦(icIEF)電泳圖。

【0123】 圖 20 描繪 MT1 冷白光或 UVA 光之暴露與經氧化之胺基酸殘基的出現(包括 SEQ ID NO.: 17、18、19、20、21、28、29 及 83)相關聯之研究的結果。

【0124】 圖 21 描繪根據一例示性實施例具有~350 nm 之吸光度(參見，例如圓圈突出顯示~350 nm)的經 CWL 應力處理之 MT1 的 3D SEC-PDA (與光電二極體陣列偵測耦合之尺寸排阻層析)層析圖，其中 **A** 展示 T=0 時之層析圖，**B** 展示在 0.5x ICH 處之層析圖。**C** 展示在 2.0x ICH 處之層析圖，且 **D** 展示由 CWL 在不同時間間隔下進行應力處理的小瓶(歸一化為 80 mg/mL)中之 MT1 影像。

【0125】 圖 22 描繪根據一例示性實施例具有~350 nm 之吸光度(參見，例如圓圈突出顯示~350 nm)的經 UVA 應力處理之 MT1 的 3D SEC-PDA 層析圖，其中 **A** 展示 T=0 時之層析圖，**B** 展示在 0.5x ICH 處之層析圖。**C** 展示在 2.0x ICH 處之層析圖，且 **D** 展示由 UVA 在不同時間間隔下進行應力處理的小瓶(歸一化為 80 mg/mL)中之 MT1 影像。

【0126】 圖 23**A** 描繪自使用 CWL 進行應力處理之樣本的 SEC-PDA 層析圖中定量得到的 A320/280 吸光度比(上圖)且圖 23**B** 描繪使用 CWL 進行應力處理之樣本中的尺寸變異體之 A320/280 吸光度比之圖表(下圖)，其中根據一例示性實施例對樣本進行應力處理。

【0127】 圖 24**A** 描繪自使用 UVA 進行應力處理之樣本的 SEC-PDA 層析圖中定量得到的 A320/280 吸光度比(上圖)且圖 24**B** 描繪使用 UVA 進行應力處理之樣本中的尺寸變異體之 A320/280 吸光度比之圖表(下圖)，其中根據一例示性實施例對樣本進行應力處理。

【0128】 圖 25**A** 描繪將各種組分與阿柏西普一起培育對顏色產生(CIE L*, a*, b*預測之 b 值)之影響的按比例估算值；且圖 25**B** 描繪實際 b 值相對於預測 b 值之圖。

【0129】 圖 26 描繪包含低半胱胺酸及低金屬之 CDM 對阿柏西普力價(**A**)、活細胞濃度(**B**)、生存力(**C**)、氨(**D**)及重量滲透濃度(**E**)之影響。

【0130】 圖 27 為展示根據一例示性實施例隨著金屬及半胱胺酸濃度之增加/減少，收穫物顏色之預測曲線的圖表(視為第 13 天 b*值)。

【0131】 圖 28 (**A-B**)描繪將各種組分與阿柏西普在廢 CDM 中一起培育對顏色產生(CIE L*, a*, b*預測之 b 值)之影響(**A**)；及對 b 值的按比例預測之影響的圖(**B**)。

【0132】 圖 28**C** 描繪在振盪瓶培養中將各種組分與阿柏西普在 CDM 中一起培育對顏色產生(CIE L*, a*, b*預測之 b 值)之按比例估算之影響。

【0133】 圖 28**D** 描繪將次牛磺酸及甲磺酸去鐵胺鹽(DFO)與阿柏西普在廢 CDM 中一起培育對顏色產生(CIE L*, a*, b*預測之「b」值)之影響。

【0134】 圖 28**E** 描繪來自振盪瓶培養的各種組分與阿柏西普個別培育對顏色產生(CIE L*, a*, b*預測之「b」值)之影響。

【0135】 圖 29 為展示在 CDM 中添加尿苷、錳、半乳糖及地塞米鬆對所產生的阿柏西普之產生力價的影響之圖表。

【0136】 圖 30 為展示在 CDM 中添加尿苷、錳、半乳糖及地塞米鬆對表現阿柏西普之細胞的生存力之影響的圖表，其中產生了阿柏西普。

【0137】 圖 31 為展示在 CDM 中添加尿苷、錳、半乳糖及地塞米鬆對表現阿柏西普之細胞的活細胞計數之影響的圖表，其中產生了阿柏西普。

【0138】 圖 32 為展示使用來自 Cygnus 3G (F550)之標準宿主細胞蛋白溶液所製備的吸光度對宿主細胞蛋白濃度(ng/mL)之標準曲線的圖表。

【0139】 圖 33 為使用非還原 SDS-PAGE 樣本緩衝液進行的 SDS-PAGE 分析之影像。

【0140】 圖 34 為使用還原 SDS-PAGE 樣本緩衝液進行的 SDS-PAGE 分析之影像。

【0141】 圖 35**A** 為在加載溶液、分別自包含 $VEGF_{165}$、mAb1 及 mAb2 之親和力層析管柱 1-3 溶析之級分中偵測到的總宿主細胞蛋白之圖表。

【0142】 圖 35**B** 為在加載溶液、分別自包含 $VEGF_{165}$、mAb1、mAb3 及 mAb4 之親和力層析管柱 1、2、4 及 5 溶析之級分中偵測到的總宿主細胞蛋白之圖表。

【0143】 圖36描繪在進行親和力層析產生之前**A**及之後**B** VEGF MiniTrap之SEC譜。

【0144】 圖37描繪VEGF MiniTrap至$VEGF_{165}$之動力學研究的草圖表示，其中所研究之 VEGF MiniTrap 構築體來自根據一些例示性實施例進行親和力層析產生之前及之後。

【0145】 圖38描繪VEGF MiniTrap至VEGF165之動力學研究的SPR感測圖，其中所研究之VEGF MiniTrap構築體來自根據一些例示性實施例進行親和力層析產生之前及之後。

【0146】 圖39為在加載溶液、自重複用於包含$VEGF_{165}$、mAb1及mAb2之管柱的親和力層析管柱溶析之級分中偵測到的總宿主細胞蛋白之圖表。

【0147】 圖40描繪根據一例示性實施例的VEGF MiniTrap MT1 (SEQ ID NO.: 46)之結構。

【0148】 圖41描繪根據一例示性實施例的VEGF MiniTrap MT6 (SEQ ID NO.: 51)之結構。

【0149】 圖42描繪MT1、MT5及MT6之天然SEC-MS分析的相對吸光度對時間(分鐘)之總離子層析圖(TIC)，以及來自TIC之低分子量區域的放大視圖。

【0150】 圖43描繪MT1及MT5主峰之去卷積質譜，以藉由闡明一些PTM來證實MiniTrap二聚物身份。

【0151】 圖44描繪MT6主峰之去卷積質譜，以藉由闡明一些PTM來證實單鏈MiniTrap身份。

【0152】 圖45**A**描繪在MT1中之低分子量雜質的相對吸光度對時間(分鐘)之圖表。

【0153】 圖45**B**描繪在MT1中之低分子量雜質的質譜。

【0154】 圖46描繪MT1之相對吸光度對時間(分鐘)之圖，其展示不存在用於將阿柏西普切割成MT1之FabRICATOR酶。

【0155】 圖47描繪MT5中之低分子量雜質的相對吸光度對時間(分鐘)之圖。

【0156】 圖 48 描繪 MT6 中之低分子量雜質的相對吸光度對時間(分鐘)之圖。

【0157】 圖 49**A** 描繪在對 VEGF MiniTrap MT6 執行 HILIC-UV/MS 時獲得的吸光度對時間(分鐘)之圖表，其中該圖表展示在 21 分鐘時主峰之溶析及在 21.5 分鐘左右時 O-聚醣之溶析。

【0158】 圖 49**B** 描繪對 VEGF MiniTrap MT6 執行 HILIC-UV/MS 時獲得的質譜，其展示在 47985.8 Da 處之主峰。

【0159】 圖 49C 描繪在進行 HILIC-UV/MS 時獲得的 VEGF MiniTrap MT6 之 O-聚醣的質譜。

【0160】 圖 50 為 VEGF MiniTrap 二聚物之影像，其中 VEGF MiniTrap 之鉸鏈區(SEQ ID NO.: 83)中的二硫橋可以平行或交叉。

【0161】 圖 51 描繪在 MT1、MT5 及 MT6 中在 Asn36 (包括 SEQ ID NO.: 100)處觀察到的聚醣分佈之相對豐度。

【0162】 圖 52 描繪在 MT1、MT5 及 MT6 中在 Asn68 (包括 SEQ ID NO.: 101)處觀察到的聚醣分佈之相對豐度。

【0163】 圖 53 描繪在 MT1、MT5 及 MT6 中在 Asn123 (包括 SEQ ID NO.: 102)處觀察到的聚醣分佈之相對豐度。

【0164】 圖 54 描繪在 MT1、MT5 及 MT6 中在 Asn196 (包括 SEQ ID NO.: 103)處觀察到的聚醣分佈之相對豐度。

【0165】 圖 55 描繪藉由親水相互作用層析(HILIC)與螢光偵測及質譜分析(全標度及疊加式)耦合得到的釋放的 N-連接之聚醣分析。

【0166】 圖 56 描繪 MT1、MT5 及 MT6 之 HILIC-FLR 層析圖。

【0167】 圖 57 描繪藉由 HILIC 與螢光偵測及質譜分析(全標度、疊加式及歸一化)耦合得到的釋放的 N-連接之聚醣分析。

【0168】 圖 58**A** 為來自 VEGF MiniTrap 樣本 MT1、MT5 及 MT6 之詳細聚醣識別及定量的表。

【0169】 圖 58**B** 為來自 VEGF MiniTrap 樣本 MT1、MT5 及 MT6 之詳細聚醣識別及定量的表。

【0170】　圖 58C 為來自 VEGF MiniTrap 樣本 MT1、MT5 及 MT6 之詳細聚醣識別及定量的表。

【0171】　圖 59 描繪根據一例示性實施例製造 MiniTrap 之例示性生產程序。

【實施方式】

【0172】　血管生成是由先前存在之脈管系統生長新血管，係高度協調之過程，其對於正常的胚胎及產後血管發育至關重要。異常或病理性血管生成係癌症及若干種視網膜疾病之標誌，在此等疾病中，促血管生成因子(諸如血管內皮生長因子(VEGF))之上調導致內皮增生增加、脈管系統形態改變及血管通透性增加。在患有各種眼病之患者的玻璃體液及視網膜脈管系統中發現水準升高之 VEGF。阻斷 VEGF 活性亦已成為治療 DME、濕性 AMD、CNV、視網膜靜脈阻塞及異常血管生成係潛在病因之其他眼病之首選療法。

【0173】　如本文所用，阿柏西普為一種該抗 VEGF 蛋白，其包含全人類胺基酸序列，該序列包含人類 VEGFR1 之第二 Ig 域及人類 VEGFR2 之第三 Ig 域，表現為與人類 IgG1 之(Fc)的內聯融合物(inline fusion)。阿柏西普結合所有形式之 VEGF-A (VEGF)，但另外結合 PlGF 及 VEGF-B。幾種其他同型二聚 VEGF MiniTrap 已作為阿柏西普之酶切產物產生或直接由宿主細胞株重組表現。VEGF MiniTrap 之一個該例子示於**圖 1** 中。在此圖中，描繪末端離胺酸(k)，一些培養過程移除此末端離胺酸，而另一些則沒有。**圖 1** 示出保留末端離胺酸之過程。通常，阿柏西普涵蓋末端離胺酸之存在及不存在。

【0174】　如本文所證明，本發明部分揭示使用 CDM 產生抗 VEGF 蛋白(實例 1)。包含使用某些 CDM 產生的阿柏西普之溶液之分析顯示出一定顏色特性，諸如強烈的黃棕色。溶液顏色之強度視所用 CDM 而定。在將溶液歸一化至 5 g/L 之濃度後，並非所有檢查的 CDM 均產生具有明顯黃棕色之樣本。

【0175】　在可注射之治療藥物溶液中的顏色(諸如黃棕色)可為不期望之特徵。其可為用於確定藥品是否滿足特定治療劑之預定純度及品質水準的重要參數。在生物製劑之製造過程中觀察到的顏色(諸如黃棕色)可能係由於該生物製劑之化學修飾、調配物賦形劑之降解產物或經由生物製劑及調配物賦形劑之反應而形成的降解產物引起。然而，該資訊對於理解顏色變化之原因可

能有價值。其亦可幫助設計短期以及長期儲存條件，以防止促成此一顏色變化之修飾。

【0176】 發明者觀察到，在抗 VEGF 蛋白溶液產生期間使用 AEX 使黃棕色著色最小化。另外，發明者發現可藉由修飾用於產生重組蛋白，諸如阿柏西普或經修飾之阿柏西普像 MiniTrap 的細胞培養物來減少黃棕色著色。

【0177】 本發明包括抗 VEGF 蛋白及使用 CDM 產生該等抗 VEGF 蛋白。另外，本發明係基於用於蛋白質產生的上游及下游製程技術之識別及最佳化。

【0178】 如本文所證明，以下列出之一些實例描述抗 VEGF 蛋白之產生(實例 1)、抗 VEGF 蛋白之經氧化的種類之產生(實例 4)、藉由最佳化培養基(實例 5)及藉由最佳化產生方法(實例 2)來減少抗 VEGF 蛋白之經氧化的種類的方法。

【0179】 許多近期之專利申請案及授權專利旨在描述各種阿柏西普種類及其產生方法，但沒有一者描述或提出本文所述之抗 VEGF 組合物及其產生方法。參見，例如，Coherus Biosciences Inc.之美國申請案第 16/566,847 號、Sam Chun Dang Pharm. Co., Ltd.之美國專利第 10,646,546 號、Formycon AG 之美國專利第 10,576,128 號、Amgen Inc.之國際申請案第 PCT/US2020/015659 號以及 Momenta Pharmaceuticals, Inc.之美國專利第 8,956,830 號；第 9,217,168 號；第 9,487,810 號；第 9,663,810 號；第 9,926,583 號；及第 10,144,944 號。

I. 所選術語之解釋

【0180】 除非另有描述，否則本文使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之普通技術人員通常所理解之相同含義。與熟練技術人員已知的本文所述之彼等類似或等同之方法及材料可用於實施本文所述之具體實施例。所提及之所有出版物以引用方式全部併入本文。

【0181】 術語「一」應理解為指代「至少一」，且術語「約」及「近似」應理解為允許標準偏差，如普通熟習此項技術者所理解，並且在提供範圍之情況下，包括端點。

【0182】 如本文所用，術語「血管生成性眼部病症」係指由血管之生長或增生或由血管滲漏引起或與之相關的任何眼部疾病。

【0183】 如本文所用，術語「化學成分確定之培養基(chemically defined medium)」或「化學成分確定之培養基(chemically defined media)」(均縮寫為「CDM」)係指其中所有成分之身份及濃度確定的合成生長培養基。化學成分確定之培養基不含細菌、酵母、動物或植物提取物、動物血清或血漿，儘管可添加單個植物或動物衍生之組分(例如蛋白質、多肽等)。化學成分確定之培養基可包含支持生長所需之無機鹽，諸如磷酸鹽、硫酸鹽及其類似物。碳源經確定，且通常為糖，諸如葡萄糖、乳糖、半乳糖及其類似物，或其他化合物，諸如甘油、乳酸鹽、乙酸鹽及其類似物。儘管某些化學成分確定之培養基亦使用磷酸鹽作為緩衝液，但可使用其他緩衝液，諸如碳酸氫鈉、HEPES、檸檬酸鹽、三乙醇胺及其類似物。市售的化學成分確定之培養基之例子包括但不限於各種經杜爾貝寇改質之伊戈爾(DME)培養基(Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.)、漢氏營養混合物(Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.)、各種 EX-CELLs 培養基(Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.)、各種 IS CHO-CD 培養基(FUJIFILM Irvine Scientific)、其組合及其類似物。製備化學成分確定之培養基的方法係此項技術中已知的，例如在美國專利第 6,171,825 號及第 6,936,441 號、WO 2007/077217 及美國專利申請公開案第 2008/0009040 號及第 2007/0212770 號，其全部教導皆以引用之方式併入本文。

【0184】 如本文所用，術語「累積量」係指在細胞培養過程中添加至生物反應器中以形成 CDM 的特定組分之總量，包括在培養開始時添加的組分之量(在第 0 天的 CDM)及隨後添加的組分之量。當計算組分之累積量時，亦包括在生物反應器產生之前(亦即，在第 0 天的 CDM 之前)添加至種菌培養物或接種物中的組分之量。累積量不受培養過程中組分隨時間損失(例如，經由代謝或化學降解)之影響。因此，具有相同累積量之組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若在不同時間將組分添加至兩種培養物中(例如，若在一種培養物中，所有組分均在開始時添加，而在另一種培養物中，組分係隨時間之推移而添加)。累積量亦不受培養過程中組分隨時間之原位合成(例如，經由代謝或化學轉化)的影響。因此，具有相同累積量之給定組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若組分係經由生物轉化過

程在兩種培養物之一種*中原位*合成。累積量可以例如組分之克數或莫耳數之單位表示。

【0185】　如本文所用，術語「累積濃度」係指組分之累積量除以生產批次開始時生物反應器中液體之體積，包括培養物中使用的任何接種物對起始體積之貢獻。例如，若生物反應器在生產批次開始時包含 2 升細胞培養基，並且在第 0、1、2 及 3 天添加 1 克之組分 X，則第 3 天之後的累積濃度為 2 g/L (亦即 4 克除以 2 升)。若在第 4 天將另外 1 升不含組分 X 之液體添加至生物反應器中，則累積濃度將保持為 2 g/L。若在第 5 天自生物反應器中損失一些液體(例如經由蒸發)，則累積濃度將保持為 2 g/L。累積濃度可以例如克/升或莫耳/升之單位表示。

【0186】　如本文所用，術語「調配物」係指與一或多種醫藥學上可接受之媒劑一起調配的感興趣之蛋白質。在一態樣中，感興趣之蛋白質為阿柏西普及/或 MiniTrap。在一些例示性實施例中，調配物中感興趣之蛋白質之量可在約 0.01 mg/mL 至約 600 mg/mL 之範圍內。在一些特定實施例中，調配物中感興趣之蛋白質之量可為約 0.01 mg/mL、約 0.02 mg/mL、約 0.03 mg/mL、約 0.04 mg/mL、約 0.05 mg/mL、約 0.06 mg/mL、約 0.07 mg/mL、約 0.08 mg/mL、約 0.09 mg/mL、約 0.1 mg/mL、約 0.2 mg/mL、約 0.3 mg/mL、約 0.4 mg/mL、約 0.5 mg/mL、約 0.6 mg/mL、約 0.7 mg/mL、約 0.8 mg/mL、約 0.9 mg/mL、約 1 mg/mL、約 2 mg/mL、約 3 mg/mL、約 4 mg/mL、約 5 mg/mL、約 6 mg/mL、約 7 mg/mL、約 8 mg/mL、約 9 mg/mL、約 10 mg/mL、約 15 mg/mL、約 20 mg/mL、約 25 mg/mL、約 30 mg/mL、約 35 mg/mL、約 40 mg/mL、約 45 mg/mL、約 50 mg/mL、約 55 mg/mL、約 60 mg/mL、約 65 mg/mL、約 70 mg/mL、約 75 mg/mL、約 80 mg/mL、約 85 mg/mL、約 90 mg/mL、約 100 mg/mL、約 110 mg/mL、約 120 mg/mL、約 130 mg/mL、約 140 mg/mL、約 150 mg/mL、約 160 mg/mL、約 170 mg/mL、約 180 mg/mL、約 190 mg/mL、約 200 mg/mL、約 225 mg/mL、約 250 mg/mL、約 275 mg/mL、約 300 mg/mL、約 325 mg/mL、約 350 mg/mL、約 375 mg/mL、約 400 mg/mL、約 425 mg/mL、約 450 mg/mL、約 475 mg/mL、約 500 mg/mL、約 525 mg/mL、約 550 mg/mL、約 575 mg/mL 或約 600 mg/mL。在一些例示性實施例中，組

合物之 pH 值可大於約 5.0。在一例示性實施例中，pH 值可大於約 5.0、大於約 5.5、大於約 6、大於約 6.5、大於約 7、大於約 7.5、大於約 8 或大於約 8.5。

【0187】 如本文所用，術語「資料庫」係指生物資訊學工具，其提供針對資料庫中所有可能序列搜尋未解釋之 MS-MS 譜的可能性。此等工具之非限制性實例為 Mascot (http://www.matrixscience.com)、Spectrum Mill (http://www.chem.agilent.com)、PLGS (http://www.waters.com)、PEAKS (http://www.bioinformaticssolutions.com)、Proteinpilot (http://download.appliedbiosystems.com//proteinpilot)、Phenyx (http://www.phenyx-ms.com)、Sorcerer (http://www.sagenresearch.com)、OMSSA (http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/)、X!Tandem (http://www.thegpm.org/TANDEM/)、Protein Prospector (http://www. http://prospector.ucsf.edu/ prospector/ mshome.htm)、Byonic (https://www.proteinmetrics.com/products/byonic)或 Sequest (http://fields.scripps.edu/sequest)。

【0188】 如本文所用，術語「超濾」或「UF」可包括類似於逆滲透之膜過濾過程，其使用靜水壓力迫使水通過半透膜。有關超濾之詳情描述於：Leos J. Zeman & Andrew L. Zydney, Microfiltration and ultrafiltration: principles and applications (1996)中，其全部教導併入本文。孔徑小於 0.1 μm 之過濾器可用於超濾。藉由使用具有如此小孔徑之過濾器，可經由使樣本緩衝液滲透穿過過濾器而將蛋白質保留在過濾器後面來減少樣本之體積。

【0189】 如本文所用，「滲濾」或「DF」可包括使用超濾器移除及交換鹽、糖及非水溶劑；將遊離種類與結合種類分離；移除低分子量材料及/或引起離子及/或 pH 環境之快速變化的方法。藉由以近似等於超濾速率之速率向經超濾之溶液中添加溶劑，可最有效地移除微溶質。由此自溶液中以恆定體積洗滌微種。在本發明之某些例示性實施例中，可使用滲濾步驟來交換用於本發明之各種緩衝液，例如，在層析或其他產生步驟之前，以及自蛋白質製劑中移除雜質。如本文所用，術語「下游製程技術」係指在上游製程技術之後用於產生蛋白質之一或多種技術。下游製程技術包括例如使用以下方法產生蛋白質產物：例如，親和力層析，包括蛋白 A 親和力層析以及使用固相之親

和力層析，該固相具有明確限定之分子像 VEGF，其可與其同源物像 VEGF 受體(VEGF R)相互作用；離子交換層析，諸如陰離子或陽離子交換層析；疏水性相互作用層析或置換層析。

【0190】　片語「重組宿主細胞」(或簡稱為「宿主細胞」)包括已引入編碼感興趣之蛋白質的重組表現載體的細胞。應理解，此一術語意欲不僅指代具體主題細胞，而且指代此一細胞之子代。因為由於突變或環境影響，某些修飾可能在後代中發生，所以該子代實際上可與親本細胞不同，但仍包括於如本文所用之術語「宿主細胞」之範疇內。在一實施例中，宿主細胞包括選自任何生命王國之原核及真核細胞。在一態樣中，真核細胞包括原生生物、真菌、植物及動物細胞。在又一態樣中，宿主細胞包括真核細胞，諸如植物及/或動物細胞。細胞可為哺乳動物細胞、魚類細胞、昆蟲細胞、兩棲類細胞或禽類細胞。在一具體態樣中，宿主細胞為哺乳動物細胞。適於在培養物中生長的廣泛多種哺乳動物細胞株可獲自例如美國菌種保存中心(Manassas, Va.)及其他寄存處以及商業供應商。可用於本發明之製程中的細胞包括但不限於 MK2.7 細胞、PER-C6 細胞、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)諸如 CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DG44 (Chasin 等人，1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556；Kolkekar 等人, 1997, *Biochemistry,* 36: 10901-10909；及 WO 01/92337 A2)、二氫葉酸還原酶陰性 CHO 細胞(CHO/-DHFR，Urlaub 及 Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77:4216)及 dp12.CHO 細胞(美國專利第 5,721,121 號)；猴腎細胞(CV1，ATCC CCL-70)；由 SV40 轉化之猴腎 CV1 細胞(COS 細胞，COS-7，ATCC CRL-1651)；HEK 293 細胞及 Sp2/0 細胞、5L8 融合瘤細胞、Daudi 細胞、EL4 細胞、HeLa 細胞、HL-60 細胞、K562 細胞、Jurkat 細胞、THP-1 細胞、Sp2/0 細胞、原代上皮細胞(例如角質細胞、宮頸上皮細胞、支氣管上皮細胞、氣管上皮細胞、腎上皮細胞及視網膜上皮細胞)以及已建立之細胞株及其品系(例如人類胚胎腎細胞(例如 293 細胞或經次選殖以便在懸浮培養中生長之 293 細胞，Graham 等人，1977，*J. Gen. Virol.*, 36:59)；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL-10)；小鼠足細胞(TM4，Mather, 1980, Biol.Reprod., 23:243-251)；人類宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL-2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL-34)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL-75)；人類肝癌

細胞(HEP-G2，HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562，ATCC CCL-51)；水牛鼠幹細胞(BRL 3A，ATCC CRL-1442)；TRI 細胞(Mather, 1982, *Annals NY Acad.Sci.*, 383:44-68)；MCR 5 細胞；FS4 細胞；PER-C6 視網膜細胞、MDBK (NBL-1)細胞、911 細胞、CRFK 細胞、MDCK 細胞、BeWo 細胞、Chang 細胞、Detroit 562 細胞、HeLa 229 細胞、HeLa S3 細胞、Hep-2 細胞、KB 細胞、LS 180 細胞、LS 174T 細胞、NCI-H-548 細胞、RPMI 2650 細胞、SW-13 細胞、T24 細胞、WI-28 VA13, 2RA 細胞、WISH 細胞、BS-C-I 細胞、LLC-MK2 細胞、Clone M-3 細胞、1-10 細胞、RAG 細胞、TCMK-1 細胞、Y-1 細胞、LLC-PK_1 細胞、PK(15)細胞、GH_1 細胞、GH_3 細胞、L2 細胞、LLC-RC 256 細胞、MH_1C_1 細胞、XC 細胞、MDOK 細胞、VSW 細胞及 TH-I, B1 細胞或其衍生物)；來自任何組織或器官(包括但不限於心臟、肝臟、腎臟、結腸、腸、食道、胃、神經組織(腦、脊髓)、肺、血管組織(動脈、靜脈、毛細血管)、淋巴組織(淋巴腺、腺樣體、扁桃體、骨髓及血液)、脾臟)之成纖維細胞、以及成纖維細胞及成纖維細胞樣細胞株(例如，TRG-2 細胞、IMR-33 細胞、Don 細胞、GHK-21 細胞、瓜胺酸血症細胞、Dempsey 細胞、Detroit 551 細胞、Detroit 510 細胞、Detroit 525 細胞、Detroit 529 細胞、Detroit 532 細胞、Detroit 539 細胞、Detroit 548 細胞、Detroit 573 細胞、HEL 299 細胞、IMR-90 細胞、MRC-5 細胞、WI-38 細胞、WI-26 細胞、MiCl1 細胞、CV-1 細胞、COS-1 細胞、COS-3 細胞、COS-7 細胞、非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587；VERO，ATCC CCL-81)；DBS-FrhL-2 細胞、BALB/3T3 細胞、F9 細胞、SV-T2 細胞、M-MSV-BALB/3T3 細胞、K-BALB 細胞、BLO-11 細胞、NOR-10 細胞、C_3H/IOTI/2 細胞、$HSDM_1C_3$ 細胞、KLN205 細胞、McCoy 細胞、小鼠 L 細胞、品系 2071 (小鼠 L)細胞、L-M 品系(小鼠 L)細胞、L-MTK (小鼠 L)細胞、NCTC 純系 2472 及 2555、SCC-PSA1 細胞、Swiss/3T3 細胞、印度黃麂細胞(Indian muntac cell)、SIRC 細胞、C_{11} 細胞及 Jensen 細胞、或其衍生物)或熟習此項技術者已知之任何其他細胞類型。

【0191】　如本文所用，術語「宿主細胞蛋白」(HCP)包括源自宿主細胞之蛋白，並且可與所需的感興趣之蛋白無關。宿主細胞蛋白可為過程相關之雜質，其可來源於製造過程，並且可包括三個主要類別：細胞受質來源、細胞

培養來源及下游來源。細胞受質來源之雜質包括但不限於來源於宿主生物之蛋白質及核酸(宿主細胞基因體、載體或總 DNA)。細胞培養來源之雜質包括但不限於誘導劑、抗生素、血清及其他培養基組分。下游來源之雜質包括但不限於酶、化學及生化處理試劑(例如，溴化氰、胍、氧化劑及還原劑)、無機鹽(例如，重金屬、砷、非金屬離子)、溶劑、載劑、配位體(例如單株抗體)及其他可浸出物。

【0192】 在一些例示性實施例中，宿主細胞蛋白可具有在約 4.5 至約 9.0 範圍內之 pI。在一例示性實施例中，pI 可為約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 5.6、約 5.7、約 5.8、約 5.9、約 6.0、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.5、約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、約 7.5、約 7.6、約 7.7、約 7.8、約 7.9、約 8.0、約 8.1、約 8.2、約 8.3、約 8.4、約 8.5、約 8.6、約 8.7、約 8.8、約 8.9 或約 9.0。

【0193】 如本文所用，術語「水解劑」係指可進行蛋白質消化的大量不同試劑中之任何一種或組合。可進行酶消化之水解劑之非限制性實例包括來自*佐氏麴菌*之蛋白酶、彈性蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、蛋白酶 XIII、胃蛋白酶、胰蛋白酶、Tryp-N、胰凝乳蛋白酶、曲黴菌素 I、LysN 蛋白酶(Lys-N)、LysC 胞內蛋白酶(Lys-C)、胞內蛋白酶 Asp-N (Asp-N)、胞內蛋白酶 Arg-C (Arg-C)、胞內蛋白酶 Glu-C (Glu-C)或外膜蛋白 T (OmpT)、釀膿鏈球菌之免疫球蛋白降解酶(IdeS)、嗜熱菌蛋白酶、木瓜蛋白酶、鏈黴蛋白酶、V8 蛋白酶或其生物活性片段或同系物或其組合。可進行非酶消化之水解劑之非限制性實例包括使用高溫、微波、超音波、高壓、紅外、溶劑(非限制性實例為乙醇及乙腈)、固定化酶消化(IMER)、磁粒固定化酶及晶片上固定化酶。有關討論可用的蛋白質消化技術之最新評論，參見 Switzar 等人,「Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments」(Linda Switzar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, *Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments*, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067-1077 (2013)，其全部教導皆併入本文)。一種水解劑或多種水解劑之組合可以序列特異性方式切割蛋白質或多肽中之肽鍵，從而產生較短肽之可預測集合。可適當選擇水解劑與蛋白質之比率及消化所需時間以獲

得蛋白質之最佳消化。當酶與受質之比率過高時，相應的高消化速率將不能為肽藉由質譜儀進行分析提供足夠的時間，並且會損害序列覆蓋率。另一方面，低 E/S 比率將需要長時間消化，且因此需要較長的數據採集時間。酶與受質之比率可在約 1:0.5 至約 1:200 範圍內。如本文所用，術語「消化」係指蛋白質之一或多個肽鍵之水解。有若干種使用適當的水解劑對生物樣本中之蛋白質進行消化之方法，例如，酶消化或非酶消化。用於消化樣本中之蛋白質的一種廣泛接受之方法涉及使用蛋白酶。有許多蛋白酶可用，且每種蛋白酶在特異性、效率及最佳消化條件方面都有其自身特徵。蛋白酶係指內肽酶及外肽酶，根據蛋白酶在肽內的非末端或末端胺基酸上之切割能力進行分類。替代地，蛋白酶亦指代六種不同的類別-天冬胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶及金屬蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、絲胺酸蛋白酶及蘇胺酸蛋白酶，根據催化機制進行分類。術語「蛋白酶」與「肽酶」可互換使用，係指水解肽鍵之酶。

【0194】　術語「與...相關聯」表示可將本發明之組分，亦即抗 VEGF 組合物與另一種劑諸如抗 ANG2 一起調配成單一組合物用於同時遞送，或單獨調配成兩種或更多種組合物(例如，包含每種組分之套組)。彼此相關聯投與之組分可在與投與其他組分不同之時間向個體投與；例如，可在給定時間段以一定時間間隔非同時(例如，單獨地或依次地)進行每次投與。彼此相關聯投與之單獨組分亦可在相同投與時段中基本上同時(例如，精確地同時或以非臨床上重要之時間段間隔開)投與。此外，彼此相關聯投與之單獨組分可藉由相同或不同途徑向個體投與，例如，阿柏西普之組合物與另一種劑諸如抗 ANG2 一起，其中阿柏西普之組合物包含約 15%或更少之其變異體。

【0195】　如本文所用，術語「液相層析」係指以下過程：當組分流過(或流入)固定液相或固相時，由於組分之差異分佈，可將由液體攜帶之生物/化學混合物分離為各組分。液相層析之非限制性實例包括逆相液相層析、離子交換層析、尺寸排阻層析、親和力層析、混合模式層析、疏水性層析或混合模式層析。

【0196】　如本文所用，「親和力層析」可包括分離，該等分離包括基於兩種物質對層析材料之親和力來分離兩種物質之任何方法。其可包含使物質經

歷包含合適的親和力層析介質之管柱。該層析介質之非限制性實例包括但不限於蛋白 A 樹脂、蛋白 G 樹脂、包含抗原(針對該抗原產生結合分子(例如抗體))之親和載體、能夠結合至感興趣之蛋白質的蛋白質及包含 Fc 結合蛋白之親和載體。在一態樣中，在樣本加載之前，可用合適的緩衝液平衡親和力管柱。合適的緩衝液之實例可為 Tris/NaCl 緩衝液，pH 值約為 7.0 至 8.0。熟練技術人員可開發合適的緩衝液而不會造成不當的負擔。此平衡之後，可將樣本加載至管柱上。加載管柱後，可使用例如平衡緩衝液將管柱洗滌一次或多次。在溶析管柱之前，可使用其他洗滌，包括採用不同緩衝液之洗滌。接著可使用適當的溶析緩衝液溶析親和力管柱。合適的溶析緩衝液之一實例可為乙酸/NaCl 緩衝液，pH 值為約 2.0 至 3.5。熟練技術人員亦可開發適當的溶析緩衝液而不會造成不當的負擔。析出液可使用熟習此項技術者熟知之技術(包括 UV)進行監測，例如，可使用 280 nm 處之吸光度，特別是如果感興趣之樣本包含芳環(例如，具有像色胺酸一樣之芳族胺基酸的蛋白質)。

【0197】　如本文所用，「離子交換層析」可指代包括任何方法之分離，藉由該方法可基於感興趣之分子及/或層析材料上(整體或局部位於感興趣之分子及/或層析材料之特定區域上)的個別離子電荷之差異來分離兩種物質，且因此可使用陽離子交換材料或陰離子交換材料。離子交換層析根據感興趣之分子之局部電荷與層析材料之局部電荷之間的差異來分離分子。填充式離子交換層析管柱或離子交換膜裝置可在結合-溶析模式、流通模式或混合模式下操作。用平衡緩衝液或另一種緩衝液洗滌管柱或膜裝置之後，可藉由提高溶析緩衝液的離子強度(亦即電導率)以與溶質競爭離子交換基質之帶電位點來實現產物回收。改變 pH 值且由此改變溶質之電荷可為實現溶質溶析之另一種方式。電導率或 pH 值之變化可為逐漸的(梯度溶析)或逐步的(分步溶析)。可將陰離子或陽離子取代基附著於基質上，以形成用於層析之陰離子或陽離子載體。陰離子交換取代基之非限制性實例包括二乙胺基乙基(DEAE)、四級胺乙基(QAE)及四級胺(Q)基團。陽離子取代基包括羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸鹽(P)及磺酸鹽(S)。纖維素離子交換介質或載體可包括可由 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K 獲得之 DE23™、DE32™、DE52™、CM-23™、CM-32™及 CM-52™。SEPHADEX®基及交

聯之離子交換劑亦為已知的。例如，DEAE-、QAE-、CM-及 SP-SEPHADEX® 以及 DEAE-、Q-、CM-及 S-SEPHAROSE®以及 SEPHAROSE® Fast Flow 及 Capto™ S 均可由 GE Healthcare 獲得。此外，DEAE 及 CM 衍生化之乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物，諸如 TOYOPEARL™ DEAE-650S 或 M 及 TOYOPEARL™ CM-650S 或 M 可由 Toso Haas Co., Philadelphia, Pa.獲得，或 Nuvia S 及 UNOSphere™ S 可由 BioRad, Hercules, Calif.獲得，Eshmuno® S 可由 EMD Millipore, MA 獲得。

【0198】 如本文所用，術語「疏水性相互作用層析樹脂」可包括固相，其可經苯基、辛基、丁基或其類似物共價修飾。其可利用疏水性將分子彼此分離。在此類型之層析中，疏水基團(諸如苯基、辛基、己基或丁基)可形成管柱之固定相。諸如蛋白質、肽及其類似物之分子穿過 HIC (疏水性相互作用層析)管柱，該管柱在其表面上具有一或多個疏水區域或具有疏水袋(pockets)，並且能夠與構成 HIC 固定相之疏水基團相互作用。HIC 樹脂或載體之實例包括 Phenyl sepharose FF、Capto Phenyl (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)、Phenyl 650-M (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan)及 Sartobind Phenyl (Sartorius corporation, New York, USA)。

【0199】 如本文所用，術語「混合模式層析」或「多模式層析」(均稱為「MMC」)包括以下層析法：其中溶質經由一種以上相互作用模式或機制與固定相相互作用。MMC 可用作傳統逆相(RP)、離子交換(IEX)及正相層析(NP)之替代或補充工具。與 RP、NP 及 IEX 層析(其中分別以疏水性相互作用、親水相互作用及離子相互作用作為主要相互作用模式)不同，混合模式層析可採用此等相互作用模式中之兩種或更多種之組合。混合模式層析介質可提供無法藉由單模式層析重現之獨特選擇性。與基於親和力之方法相比，混合模式層析亦可節省潛在成本、延長管柱壽命及提高操作靈活性。在一些例示性實施例中，混合模式層析介質可包含直接或經由間隔體與有機或無機載體(有時表示為基礎基質)偶聯之混合模式配位體。載體可呈以下形式：顆粒，諸如基本上呈球形之顆粒、整料、過濾器、膜、表面、毛細管等。在一些例示性實施例中，載體可由天然聚合物諸如交聯碳水化合物材料諸如瓊脂糖、agPV、纖維素、聚葡糖、殼聚醣、蒟蒻、角叉菜膠、結冷膠、藻酸鹽

等來製備。為了獲得高吸附能力，載體可為多孔的，且接著將配位體偶聯至外表面以及孔表面。此等天然聚合物載體可根據標準方法製備，諸如反相懸浮凝膠化(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964)，其全部教導併入本文)。替代地，可由以下物質來製備載體：合成聚合物，諸如交聯合成聚合物，例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯醯胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯酯、乙烯醯胺及其類似物。此等合成聚合物可根據標準方法產生，例如「藉由懸浮聚合開發的苯乙烯基聚合物載體」(R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)，其全部教導併入本文)。多孔的天然或合成聚合物載體亦可由諸如 GE Healthcare, Uppsala, Sweden 之商業來源獲得。

【0200】　如本文所用，術語「質譜儀」包括能夠識別特定分子種類並量測其準確質量之裝置。該術語旨在包括可表徵多肽或肽之任何分子偵測器。質譜儀可包括三個主要部分：離子源、質量分析儀及偵測器。離子源之作用係產生氣相離子。可將分析物之原子、分子或簇轉移至氣相中並同時(如以電灑遊離化)或經由單獨過程遊離化。離子源之選擇視應用而定。在一些例示性實施例中，質譜儀可為串聯質譜儀。如本文所用，術語「串聯質譜」包括其中藉由使用質量選擇及質量分離之多個階段獲得關於樣本分子之結構資訊的技術。先決條件係將樣本分子轉化為氣相並遊離化，以便在第一質量選擇步驟之後以可預測及可控制之方式形成片段。多階段 MS/MS 或 MS^n 可藉由首先選擇及分離前驅體離子(MS^2)，使其片段化，分離初級片段離子(MS^3)，使其片段化，分離次級片段(MS^4)等方式進行，只要可獲得有意義之資訊，或片段離子信號為可偵測的。串聯 MS 已成功地與廣泛多種分析儀組合一起使用。可根據許多不同因素(諸如靈敏度、選擇性及速度，以及尺寸、成本及可用性)來確定為某種應用組合哪種分析儀。串聯 MS 方法之兩個主要類別為空間串聯及時間串聯，但亦有一些混合方案，其中時間串聯分析儀在空間中或與空間串聯分析儀耦合。空間串聯質譜儀包括離子源、前驅體離子活化裝置及至少兩個非捕獲質量分析儀。特定的 m/z 分離功能可經設計，以便在儀器之一個部分中選擇離子，在中間區域將其解離，接著將產物離子傳輸至另一分析儀以進行 m/z 分離及數據採集。在時間串聯質譜儀中，可在

同一物理裝置中捕獲、分離、片段化及 m/z 分離離子源中產生之離子。質譜儀所識別之肽可用作完整蛋白及其翻譯後修飾之替代代表。其可藉由將實驗與理論 MS/MS 數據相關聯來用於蛋白質表徵，理論 MS/MS 數據係由蛋白質序列資料庫中之可能的肽產生。該表徵包括但不限於對蛋白質片段之胺基酸進行定序；確定蛋白質定序；確定蛋白質從頭定序；定位翻譯後修飾或識別翻譯後修飾；或可比性分析；或其組合。

【0201】　如本文所用，「Mini-Trap」或「MiniTrap」或「MiniTrap 結合分子」能夠結合至 VEGF 分子。此等 MiniTrap 可包括(i)嵌合多肽以及(ii)包含兩個或更多個例如經由一或多個二硫橋非共價結合之多肽的多聚(例如，二聚)分子。MiniTrap 可經由化學修飾、酶促活性產生或重組製備。

【0202】　如本文所用，「VEGF MiniTrap」或「VEGF MiniTrap 結合分子」可為與 VEGF 結合且具有一或多組 VEGF 受體 Ig 樣域(或其變異體)(例如，VEGFR1 Ig 域 2 及/或 VEGFR2 Ig 域 3 及/或 4)之分子或分子複合物以及經修飾或不存在之多聚組分(MC)，例如，其中 MC 為經修飾之免疫球蛋白 Fc。該修飾可為 VEGF trap (例如，阿柏西普或康柏西普(conbercept))之蛋白水解消化或具有經縮短之 MC 序列的所得多肽鏈之直接表現的結果。(參見**圖 1** 中描繪之分子結構) **圖 1** 為 VEGF MiniTrap 分子之描繪，其為用釀膿鏈球菌 IdeS 蛋白水解阿柏西普之產物。描繪同型二聚分子，其具有經由兩個平行二硫鍵連接之 Ig 鉸鏈域片段。指示 VEGFR1 域、VEGFR2 域及鉸鏈域片段(MC)。阿柏西普中發生 IdeS 切割之點用「//」指示。亦指示自阿柏西普切下之 Fc 片段。未經二聚化之單個此等嵌合多肽若具有 VEGF 結合活性則亦可為 VEGF MiniTrap。術語「VEGF MiniTrap」包括單個多肽，其包含第一組一或多個 VEGF 受體 Ig 域(或其變異體)，該 Ig 域缺乏 MC 但以連接子(例如，肽連接子)與一或多個其他組之一或多個 VEGF 受體 Ig 域(或其變異體)融合。在本發明之 VEGF MiniTrap 中的 VEGF 結合域可彼此相同或不同(參見 WO2005/00895，其全部教導皆併入本文)。

【0203】　例如，在本發明之一實施例中，未經修飾之免疫球蛋白 Fc 域包含以下胺基酸序列或其胺基酸 1-226：

DKTHTCPX$_1$CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKX$_2$TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.: 33；其中 X$_1$ 為 L 或 P 且 X$_2$ 為 A 或 T)。

【0204】 VEGF 之抑制包括例如 VEGF 與 VEGF 受體結合之拮抗作用，例如藉由與 VEGF 受體競爭 VEGF (例如，VEGF$_{110}$、VEGF$_{121}$ 及/或 VEGF$_{165}$) 結合。該抑制可造成 VEGF 介導之 VEGFR 活化的抑制，例如，表現嵌合 VEGF 受體(例如，其同型二聚物)之細胞株(例如，HEK293)中螢光素酶表現之抑制，該細胞株在細胞表面上具有與 IL18Rα 及/或 IL18Rβ 胞內域融合之 VEGFR 胞外域且亦具有 NFkB-螢光素酶-IRES-eGFP 報告基因，例如本文所列舉之細胞株 HEK293/D9/Flt-IL18Rα/Flt-IL18Rβ。

【0205】 本發明之 VEGF MiniTrap 之 VEGF 受體 Ig 域組分可包括：

(i) VEGFR1 (Flt1)之一或多個免疫球蛋白樣(Ig)域 2 (R1D2)，

(ii) VEGFR2 (Flk1 或 KDR)之一或多個 Ig 域 3 (Flk1D3)(R2D3)，

(iii) VEGFR2 (Flk1 或 KDR)之一或多個 Ig 域 4 (Flk1D4)(R2D4)，及/或

(iv) VEGFR3 (Flt4)之一或多個 Ig 域 3 (Flt1D3 或 R3D3)。

【0206】 VEGF 受體之免疫球蛋白樣域在本文中可稱為 VEGFR「Ig」域。本文所提及之 VEGFR Ig 域，例如 R1D2 (在本文中可稱為 VEGFR1(d2))、R2D3 (在本文中可稱為 VEGFR2(d3))、R2D4 (在本文中可稱為 VEGFR2(d4)) 及 R3D3 (在本文中可稱為 VEGFR3(d3))旨在不僅涵蓋完整的野生型 Ig 域，而且亦涵蓋實質上保留野生型結構域之功能特徵的其變異體，例如，當併入 VEGF MiniTrap 中時，保留形成功能性 VEGF 結合域之能力。熟習此項技術者顯而易知，可獲得上述 Ig 域之許多變異體，其將保留與野生型結構域實質上相同之功能特徵。

【0207】 本發明提供包含以下域結構之 VEGF MiniTrap 多肽：

- ((R1D2)-(R2D3))$_a$-連接子-((R1D2)-(R2D3))$_b$；
- ((R1D2)-(R2D3)-(R2D4))$_c$-連接子-((R1D2)-(R2D3)-(R2D4))$_d$；

● $((R1D2)-(R2D3))_e-(MC)_g$；

● $((R1D2)-(R2D3)-(R2D4))_f-(MC)_g$；

其中，

- R1D2 為 VEGF 受體 1 (VEGFR1) Ig 域 2 (D2)；

- R2D3 為 VEGFR2 Ig 域 3；

- R2D4 為 VEGFR2 Ig 域 4；

- MC 為多聚組分(例如，IgG 鉸鏈域或其片段，例如來自 IgG1)；

- 連接子為包含約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 個胺基酸之肽，例如$(GGGS)_g$；

並且，

獨立地，

a= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；

b= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；

c= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；

d= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；

e= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；

f= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15；且

g= 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15。

【0208】 在本發明之一實施例中，R1D2 包含胺基酸序列：SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID (SEQ ID NO.: 34)。在一態樣中，R1D2 缺少 N 端 SDT。

【0209】 在本發明之一實施例中，R1D2 包含胺基酸序列：PFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQT (SEQ ID NO.: 35)。

【0210】 在本發明之一實施例中，R2D3 包含胺基酸序列：VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR

DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EK (SEQ ID NO.: 36)。

【0211】 在本發明之一實施例中，R2D4 包含胺基酸序列：PFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIK AGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPG (SEQ ID NO.: 37)。

【0212】 在本發明之一實施例中，R2D4 包含胺基酸序列：FVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA GHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPIKSEKQSHVVSLVVYVP (SEQ ID NO.: 38)。

【0213】 在本發明之一實施例中，用於 VEGF MiniTrap 中之多聚組分(MC)為肽，例如，經修飾之 Fc 免疫球蛋白(例如，來自 IgG1)，其能夠與另一多聚組分結合。在一態樣中，MC 為包括免疫球蛋白鉸鏈區的經修飾之 Fc 免疫球蛋白。例如，在本發明之一實施例中，MC 為包含一或多個(例如 1、2、3、4、5 或 6 個)半胱胺酸之肽，此等半胱胺酸能夠與另一個 MC 中之半胱胺酸形成一或多個半胱胺酸橋，例如 DKTHTCPPC (SEQ ID NO.: 39)、DKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO.: 40)、DKTHTCPPCPPCPPC (SEQ ID NO.: 41)、$DKTHTC(PPC)_h$ (其中 h 為 1、2、3、4 或 5)、DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 60)、DKTHTCPLCPAPELLG (SEQ ID NO.: 43)、DKTHTC (SEQ ID NO.: 44)或 DKTHTCPLCPAP (SEQ ID NO.: 45)。

【0214】 本發明亦提供一種包含以下域結構之 VEGF MiniTrap 多肽：

(i) $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(MC)_c$；或

(ii) $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(R2D4)_c$-$(MC)_d$；

其可例如藉由每個多肽之 MC 之間的結合與第二該等多肽同型二聚，

其中

(i) 該等 R1D2 域配位；

(ii) 該等 R2D3 域配位；及/或

(iii) 該等 R2D4 域配位，

以形成二聚 VEGF 結合域。

【0215】 在本發明之一實施例中，VEGF MiniTrap 多肽包含以下胺基酸序列：

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N**$_{36}$ITVTLKKFPLDTLIPD
GKRIIWDSRKGFIIS**N**$_{68}$ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVL**N**$_{123}$CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN
RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N**$_{196}$STFV
RVHEKDKTHTCPPC**PAPELLG** (SEQ ID NO.: 46；MC 加下劃線)；

GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRII
WDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS
HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQS
GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHENLSVA
FGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHV
LTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPGDKTHTCPLC
PAPELLG (SEQ ID NO.: 47；MC 加下劃線)；

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N**$_{36}$ITVTLKKFPLDTLIPD
GKRIIWDSRKGFIIS**N**$_{68}$ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVL**N**$_{123}$CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN
RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N**$_{196}$STFV
RVHEKDKTHTCPPC (SEQ ID NO.: 48；MC 加下劃線)；

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N**$_{36}$ITVTLKKFPLDTLIPD
GKRIIWDSRKGFIIS**N**$_{68}$ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVL**N**$_{123}$CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN
RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N**$_{196}$STFV
RVHEKDKTHTCPPC**PPC** (SEQ ID NO.: 49；MC 加下劃線)；

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N**$_{36}$ITVTLKKFPLDTLIPD
GKRIIWDSRKGFIIS**N**$_{68}$ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVL**N**$_{123}$CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN
RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N**$_{196}$STFV
RVHEKDKTHTCPPC**PPCPPC** (SEQ ID NO.: 50；MC 加下劃線)；或

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV
LSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDL
KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
DKTHTC-(PPC)x (MC 加下劃線；其中 x 為 1、2、3、4 或 5)。如所討論，該等多肽可經多聚化(例如二聚化(例如，同型二聚化))，其中多肽之間的結合係經由多聚化組分介導。

【0216】 在本發明之一實施例中，本發明之單體 VEGF MiniTrap 之 VEGFR1 Ig 樣域 2 在 N36 及/或 N68 處具有 N 連接之醣化作用；及/或在 C30 與 C79 之間具有鏈內二硫橋；及/或本發明之單體 VEGF MiniTrap 之 VEGFR2 Ig 樣域 3 在 N123 及/或 N196 處具有 N 連接之醣化作用；及/或在 C124 與 C185 之間具有鏈內二硫橋。

【0217】 在本發明之一實施例中，VEGF MiniTrap 包含以下結構：

- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_3$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$；
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_6$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$；
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_9$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$；或
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_{12}$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$。

G_4S 為-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-

【0218】 在本發明之一實施例中，VEGF MiniTrap 包含以下胺基酸序列：

(i)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV
LSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDL
KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIH
MTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYK
EIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC
TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDG

VTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 51；連接子加下劃線)；

(iii)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK<u>GGGGSGGGGSGGGGS</u>SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 52；連接子加下劃線)；

(iv)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u>SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 53；連接子加下劃線)；

(v)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG</u>

GGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITV TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTN YLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPS SKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGL MTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 54；連接子加下劃線)；

或

(vi)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV LSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

-(GGGGS)x

-SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPD GKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDV VLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRD LKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHE K

(其中 x 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15)。如本文所討論，此等多肽可包含二級結構，其中同樣的 VEGFR Ig 結構域締合以形成鏈內 VEGF 結合域(例如，**圖 2**)。在本發明之一實施例中，兩個或更多個此等多肽多聚化(例如，二聚化(例如，同型二聚化))，其中每條鏈之 VEGFR Ig 域與另一條鏈之同樣 Ig 域締合以形成鏈間 VEGF 結合域。

【0219】 在本發明之某一實施例中，本發明之 VEGF MiniTrap 缺乏對 VEGF MiniTrap 多肽之胺基酸殘基的任何顯著修飾(例如，例如在 N 端及/或 C 端處之直接化學修飾，諸如 PEG 化或碘乙醯胺化)。

【0220】 在本發明之一實施例中，多肽包含二級結構，其中在單個嵌合多肽(例如，$(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-連接子-$(R1D2)_c$-$(R2D3)_d$；或 $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(R2D4)_c$-連接子-$(R1D2)_d$-$(R2D3)_e$-$(R2D4)_f$)中或在單獨的嵌

合多肽(例如，同型二聚物)中之同樣的 VEGFR Ig 域配位以形成 VEGF 結合域。例如，其中

(i) 該等 R1D2 域配位；

(ii) 該等 R2D3 域配位；及/或

(iii) 該等 R2D4 域配位，

以形成 VEGF 結合域。**圖 2** 為描繪該域配位之單鏈 VEGF MiniTrap 的說明。指示 VEGFR1、VEGFR2 及連接子域。所示連接子為$(G_4S)_6$。本發明包括具有$(G_4S)_3$；$(G_4S)_9$ 或$(G_4S)_{12}$ 連接子之單鏈 VEGF MiniTrap。

【0221】　另外，本發明亦提供一種複合物，其包含與 VEGF 多肽或其片段或其融合物複合的本文所述之 VEGF MiniTrap。在本發明之一實施例中，將 VEGF (例如，$VEGF_{165}$)同型二聚化及/或將 VEGF MiniTrap 在 2:2 複合物(2 個 VEGF:2 個 MiniTrap)中同型二聚化及/或將 VEGF MiniTrap 在 1:1 複合物中同型二聚化。複合物可包括與同型二聚化之 VEGF MiniTrap 多肽結合的同型二聚化之 VEGF 分子。在本發明之一實施例中，複合物係在活體外(例如，固定在固體基質上)或在個體體內。本發明亦包括與 VEGF MiniTrap 複合的 VEGF 二聚物(例如，$VEGF_{165}$)之複合物的組合物。

【0222】　如本文所用，術語「蛋白質」或「感興趣之蛋白質」可包括具有共價連接之醯胺鍵的任何胺基酸聚合物。感興趣之蛋白質之實例包括但不限於阿柏西普及 MiniTrap。蛋白質包含一或多條胺基酸聚合物鏈，在此項技術中通常稱為「多肽」。「多肽」係指由胺基酸殘基、相關天然存在之結構變異體及其經由肽鍵連接的合成的非天然存在之類似物、相關天然存在之結構變異體及其合成的非天然存在之類似物構成的聚合物。「合成肽或多肽」係指非天然存在之肽或多肽。合成肽或多肽可例如使用自動多肽合成器來合成。各種固相肽合成方法係熟習此項技術者已知的。蛋白質可包含一個或多個多肽以形成單一功能之生物分子。另一例示性態樣，蛋白質可包括抗體片段、奈米抗體、重組抗體嵌合體、細胞介素、趨化介素、肽激素及其類似物。感興趣之蛋白質可包括以下任一者：生物治療性蛋白、用於研究或療法中之重組蛋白、trap 蛋白及其他嵌合受體 Fc 融合蛋白、嵌合蛋白、抗體、單株抗體、多株抗體、人類抗體及雙特異性抗體。在一具體態樣中，感興趣之蛋

白質為抗 VEGF 融合蛋白(例如，阿柏西普或 MiniTrap)。可使用以下基於重組細胞之生產系統來產生蛋白質，諸如昆蟲桿狀病毒系統、酵母系統(例如畢赤酵母屬(Pichia sp.))、哺乳動物系統(例如 CHO 細胞及 CHO 衍生物，像 CHO-K1 細胞)。有關討論生物治療性蛋白及其產生之最新評論，參見 Ghaderi 等人，「Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation,」 (Darius Ghaderi 等人, Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012)，其全部教示皆併入本文)。在一些例示性實施例中，蛋白質包含修飾、加合物及其他共價連接之部分-此等修飾、加合物及部分包括例如抗生物素蛋白、鏈黴親和素、生物素、聚醣(例如，N-乙醯半乳糖胺、半乳糖、神經胺糖酸、N-乙醯基葡糖胺、岩藻醣、甘露糖及其他單醣)、PEG、聚組胺酸、FLAGtag、麥芽糖結合蛋白(MBP)、幾丁質結合蛋白(CBP)、麩胱甘肽-S-轉移酶(GST) myc 表位、螢光標記及其他染料、及其類似物。蛋白質可根據組成及溶解度來分類，且因此可包括簡單蛋白質，諸如球狀蛋白質及纖維狀蛋白質；複合蛋白，諸如核蛋白、醣蛋白、黏蛋白、色蛋白、磷蛋白、金屬蛋白及脂蛋白；以及衍生蛋白，諸如初級衍生蛋白及次級衍生蛋白。

【0223】 在一些例示性實施例中，感興趣之蛋白質可為重組蛋白、抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體、抗體片段、單株抗體、融合蛋白、scFv 及其組合。

【0224】 如本文所用，術語「重組蛋白」係指由於重組表現載體上攜帶之基因之轉錄及翻譯而產生的蛋白，該重組表現載體已引入合適的宿主細胞中。在某些例示性實施例中，重組蛋白可為融合蛋白。在一具體態樣中，重組蛋白為抗 VEGF 融合蛋白(例如，阿柏西普或 MiniTrap)。在某些例示性實施例中，重組蛋白可為抗體，例如，嵌合的、人類化的或完全人類抗體。在某些例示性實施例中，重組蛋白可為選自由以下組成之群組的同種型抗體：IgG、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。在某些例示性實施例中，抗體分子為

全長抗體(例如，IgG1)，或替代地，抗體可為片段(例如，Fc 片段或 Fab 片段)。

【0225】 如本文所用，術語「抗體」包括包含藉由二硫鍵互連之四條多肽鏈(亦即兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈)的免疫球蛋白分子，以及其多聚物(例如，IgM)。每條重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為 HCVR 或 VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，即 CH1、CH2 及 CH3。每條輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為 LCVR 或 VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域(CL1)。VH 區及 VL 區可進一步再分成稱為互補決定區(CDR)之高變區，散佈有稱為構架區(FR)之較保守區。各 VH 及 VL 由三個 CDR 及四個 FR 組成，該等區依以下順序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。在本發明之不同實施例中，抗 big-ET-1 抗體(或其抗原結合部分)之 FR 可與人類生殖系序列相同，或者可為天然或人工修飾的。可基於兩個或更多個 CDR 之並排分析來定義胺基酸共有序列。如本文所用，術語「抗體」亦包括全抗體分子之抗原結合片段。如本文所用，術語抗體之「抗原結合部分」、抗體之「抗原結合片段」及其類似者包括特異性結合抗原以形成複合物之任何天然存在的、以酶促方式獲得的、合成或基因工程改造之多肽或醣蛋白。抗體之抗原結合片段可使用以下任何合適的標準技術例如由全抗體分子衍生而來：諸如蛋白水解消化或重組基因工程技術，其涉及編碼抗體可變域及視情況之恆定域的 DNA 之操縱及表現。該 DNA 為已知的及/或可易於由例如商業來源、DNA 庫(包括例如噬菌體-抗體庫)獲得，或者可經合成。可以化學方式或藉由使用分子生物學技術對 DNA 進行定序及操縱，例如以將一或多個可變域及/或恆定域排列成合適的構型；或引入密碼子；產生半胱胺酸殘基；修飾、添加或刪除胺基酸等。

【0226】 如本文所用，「抗體片段」包括完整抗體之一部分，諸如例如抗體之抗原結合或可變區。抗體片段之實例包括但不限於 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')2 片段、scFv 片段、Fv 片段、dsFv 雙抗體、dAb 片段、Fd'片段、Fd 片段及經分離之互補決定區(CDR)區域，以及由抗體片段形成之三抗體、四抗體、線性抗體、單鏈抗體分子及多特異性抗體。Fv 片段為免疫球蛋白重鏈與輕鏈可變區之組合，且 ScFv 蛋白為重組單鏈多肽分子，其中免疫球蛋

白輕鏈與重鏈可變區經由肽連接子連接。在一些例示性實施例中，抗體片段包含親本抗體之足夠的胺基酸序列，其為與親本抗體結合相同抗原之片段；在一些例示性實施例中，片段以與親本抗體相當之親和力結合至抗原及/或與親本抗體競爭結合至抗原。抗體片段可藉由任何方式產生。例如，抗體片段可藉由完整抗體之片段化以酶促(enzymatically)或化學方式產生及/或其可由編碼部分抗體序列之基因以重組方式產生。替代或另外，抗體片段可全部或部分合成地產生。抗體片段可視情況包含單鏈抗體片段。替代或另外，抗體片段可包含例如藉由二硫鍵聯連接在一起之多條鏈。抗體片段可視情況包含多分子複合物。功能性抗體片段通常包含至少約 50 個胺基酸，且更通常包含至少約 200 個胺基酸。

【0227】　術語「雙特異性抗體」包括能夠選擇性地結合兩個或更多個表位之抗體。雙特異性抗體通常包含兩條不同重鏈，每條重鏈特異性結合不同表位-在兩種不同分子(例如，抗原)上或在相同分子(例如，相同抗原)上。若雙特異性抗體能夠選擇性地結合兩個不同表位(第一表位及第二表位)，則第一重鏈對第一表位之親和力通常比第一重鏈對第二表位之親和力低至少一個至兩個或三個或四個數量級，且反之亦然。由雙特異性抗體識別之表位可在相同或不同靶標上(例如，在相同或不同蛋白質上)。雙特異性抗體可例如藉由組合識別相同抗原之不同表位的重鏈來製備。例如，可將編碼識別相同抗原之不同表位的重鏈可變序列的核酸序列與編碼不同重鏈恆定區之核酸序列融合，並且可在表現免疫球蛋白輕鏈之細胞中表現該等序列。

【0228】　典型的雙特異性抗體具有兩條重鏈，每條重鏈均具有三個重鏈 CDR，繼之以 CH1 域、鉸鏈、CH2 域及 CH3 域；及免疫球蛋白輕鏈，其不賦予抗原結合特異性但可與每條重鏈締合，或可與每條重鏈締合且可結合由重鏈抗原結合區結合之一或多個表位，或者可與每條重鏈締合並能夠將一條或兩條重鏈結合至一個或兩個表位。BsAb 可分為兩種主要類別，一類為帶有 Fc 區之抗體(IgG 樣)，而另一類為缺少 Fc 區之抗體，後者通常小於包含 Fc 之 IgG 及 IgG 樣雙特異性分子。IgG 樣 bsAb 可具有不同形式，諸如但不限於三功能抗體(triomab)、杵臼 IgG (kih IgG)、crossMab、orth-Fab IgG、雙可變域 Ig (DVD-Ig)、二合一或雙重作用的 Fab (DAF)、IgG 單鏈 Fv (IgG-scFv)

或 κλ 體。非 IgG 樣不同形式包括串聯 scFv、雙抗體形式、單鏈雙抗體、串聯雙抗體(TandAbs)、雙親和重靶向分子(DART)、DART-Fc、奈米抗體或藉由對接鎖定(DNL)方法產生之抗體(Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130；Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265–310 (2014)，其全部教導皆併入本文)。產生 bsAb 之方法不限於基於兩種不同融合瘤細胞株之體細胞融合的四源融合瘤技術、涉及化學交聯劑之化學偶聯以及利用重組 DNA 技術之遺傳方法。bsAb 之實例包括在以下專利申請案(其以引用之方式併入本文)中揭示之彼等：2010 年 6 月 25 日提出申請之美國第 12/823838 系列號；2012 年 6 月 5 日提出申請之美國第 13/488628 系列號；2013 年 9 月 19 日提出申請之美國第 14/031075 系列號；2015 年 7 月 24 日提出申請之美國第 14/808171 系列號；2017 年 9 月 22 日提出申請之美國第 15/713574 系列號；2017 年 9 月 22 日提出申請之美國第 15/713569 系列號；2016 年 12 月 21 日提出申請之美國第 15/386453 系列號；2016 年 12 月 21 日提出申請之美國第 15/386443 系列號；2016 年 7 月 29 日提出申請之美國第 15/22343 系列號；及 2017 年 11 月 15 日提出申請之美國第 15814095 系列號。在製造雙特異性抗體之幾個步驟中，可存在少量同型二聚物雜質。當使用完整質量分析進行偵測時，此等同型二聚物雜質之偵測可具有挑戰性，因為同型二聚物雜質之豐度低並且當使用常規液相層析法進行偵測時，此等雜質與主要種類共溶析。

【0229】　如本文所用，「多特異性抗體」係指對至少兩種不同抗原具有結合特異性之抗體。儘管此等分子通常僅結合兩種抗原(亦即雙特異性抗體，bsAb)，但具有額外特異性之抗體(諸如三特異性抗體及 KIH 三特異性抗體)亦可由本文揭示之系統及方法提出。

【0230】　如本文所用，術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。單株抗體可藉由此項技術可獲得或已知之任何手段衍生自單一純系，包括任何真核、原核或噬菌體純系。可使用此項技術已知之廣泛多種技術來製

備可用於本揭露之單株抗體，包括使用融合瘤、重組及噬菌體展示技術或其組合。

【0231】　在一些例示性實施例中，感興趣之蛋白質可具有在約 4.5 至約 9.0 範圍內之 pI。在一例示性特定實施例中，pI 可為約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 5.6、約 5.7、約 5.8、約 5.9、約 6.0、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.5、約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、約 7.5、約 7.6、約 7.7、約 7.8、約 7.9、約 8.0、約 8.1、約 8.2、約 8.3、約 8.4、約 8.5、約 8.6、約 8.7、約 8.8、約 8.9 或約 9.0。在一些例示性實施例中，組合物中感興趣之蛋白質之類型可不止一種。

【0232】　在一些例示性實施例中，感興趣之蛋白質可由哺乳動物細胞產生。哺乳動物細胞可具有人類來源或非人類來源，可包括原代上皮細胞(例如，角質細胞、宮頸上皮細胞、支氣管上皮細胞、氣管上皮細胞、腎上皮細胞及視網膜上皮細胞)；已建立之細胞株及其品系(例如，293 胚胎腎細胞、BHK 細胞、HeLa 宮頸上皮細胞及 PER-C6 視網膜細胞、MDBK (NBL-1)細胞、911 細胞、CRFK 細胞、MDCK 細胞、CHO 細胞、BeWo 細胞、Chang 細胞、Detroit 562 細胞、HeLa 229 細胞、HeLa S3 細胞、Hep-2 細胞、KB 細胞、LSI80 細胞、LS174T 細胞、NCI-H-548 細胞、RPMI2650 細胞、SW-13 細胞、T24 細胞、WI-28 VA13, 2RA 細胞、WISH 細胞、BS-C-I 細胞、LLC-MK2 細胞、Clone M-3 細胞、1-10 細胞、RAG 細胞、TCMK-1 細胞、Y-l 細胞、LLC-PKi 細胞、PK(15)細胞、GHi 細胞、GH3 細胞、L2 細胞、LLC-RC 256 細胞、MHiCi 細胞、XC 細胞、MDOK 細胞、VSW 細胞及 TH-I, B1 細胞、BSC-1 細胞、RAf 細胞、RK-細胞、PK-15 細胞或其衍生物)、來自任何組織或器官(包括但不限於心臟、肝臟、腎臟、結腸、腸、食道、胃、神經組織(腦、脊髓)、肺、血管組織(動脈、靜脈、毛細血管)、淋巴組織(淋巴腺、腺樣體、扁桃體、骨髓及血液)、脾臟)之成纖維細胞、以及成纖維細胞及成纖維細胞樣細胞株(例如，CHO 細胞、TRG-2 細胞、IMR-33 細胞、Don 細胞、GHK-21 細胞、瓜胺酸血症細胞、Dempsey 細胞、Detroit 551 細胞、Detroit 510 細胞、Detroit 525 細胞、Detroit 529 細胞、Detroit 532 細胞、Detroit 539 細胞、Detroit 548 細胞、Detroit 573 細胞、HEL 299 細胞、IMR-90 細胞、MRC-5 細胞、WI-38

細胞、WI-26 細胞、Midi 細胞、CHO 細胞、CV-1 細胞、COS-1 細胞、COS-3 細胞、COS-7 細胞、Vero 細胞、DBS-FrhL-2 細胞、BALB/3T3 細胞、F9 細胞、SV-T2 細胞、M-MSV-BALB/3T3 細胞、K-BALB 細胞、BLO-11 細胞、NOR-10 細胞、C3H/IOTI/2 細胞、HSDMiC3 細胞、KLN205 細胞、McCoy 細胞、小鼠 L 細胞、品系 2071 (小鼠 L)細胞、L-M 品系(小鼠 L)細胞、L-MTK' (小鼠 L)細胞、NCTC 純系 2472 及 2555、SCC-PSA1 細胞、Swiss/3T3 細胞、印度黃麂細胞、SIRC 細胞、Cn 細胞及 Jensen 細胞、Sp2/0、NS0、NS1 細胞或其衍生物)。

【0233】 如本文所用，術語「蛋白質烷化劑」係指用於烷化蛋白質中某些遊離胺基酸殘基之試劑。蛋白質烷化劑之非限制性實例為碘乙醯胺(IOA)、氯乙醯胺(CAA)、丙烯醯胺(AA)、N-乙基馬來亞醯胺(NEM)、甲烷硫代磺酸甲酯(MMTS)及 4-乙烯基吡啶或其組合。

【0234】 如本文所用，「蛋白質變性」可指代其中分子之三維形狀自其天然狀態改變之過程。蛋白質變性可使用蛋白質變性劑進行。蛋白質變性劑之非限制性實例包括熱、高或低 pH 值、還原劑像 DTT (參見下文)或暴露於離液劑。幾種離液劑可用作蛋白質變性劑。離液溶質藉由干擾由非共價力(諸如氫鍵、範德華力及疏水作用)介導之分子內相互作用增加系統之熵。離液劑之非限制性實例包括丁醇、乙醇、氯化胍、過氯酸鋰、乙酸鋰、氯化鎂、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸鈉、硫脲、N-月桂醯基肌胺酸、尿素及其鹽。

【0235】 如本文所用，術語「蛋白質還原劑」係指用於還原蛋白質中之二硫橋的試劑。用於還原蛋白質之蛋白質還原劑之非限制性實例為二硫蘇糖醇(DTT)、β-巰基乙醇、愛耳門氏試劑(Ellman's reagent)、鹽酸羥胺、氰基硼氫化鈉、參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(TCEP-HCl)或其組合。

【0236】 如本文所用，術語多肽(例如，VEGFR Ig 域之多肽)之「變異體」係指包含與感興趣之蛋白質的參考或天然胺基酸序列至少約 70-99.9% (*例如* 70%、71%、72%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%)一致或相似之胺基酸序列的多肽。可藉由例如 BLAST 算法來執行序列比較，其中選擇算法之參數以在

個別參考序列之整個長度上給出個別序列之間的最大匹配(例如，預期閾值：10；字長：3；查詢範圍內之最大匹配：0；BLOSUM 62 矩陣；缺口成本：存在 11，延伸 1；條件組成評分矩陣調整)。多肽(例如，VEGFR Ig 域之多肽)之變異體亦可指代除一或多個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個)突變諸如錯義突變(例如保守取代)、無義突變、缺失或插入之外包含參考胺基酸序列之多肽。以下參考文獻涉及經常用於序列分析之 BLAST 算法：BLAST ALGORITHMS: Altschul 等人 (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109；Altschul, S. F.,等人, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410；Gish, W.,等人, (1993) Nature Genet. 3:266-272；Madden, T. L.,等人, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141；Altschul, S. F.,等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；Zhang, J.,等人, (1997) Genome Res. 7:649-656；Wootton, J. C.,等人, (1993) Comput. Chem. 17:149-163；Hancock, J. M.等人, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70；ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O.,等人,「A model of evolutionary change in proteins.」，Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) 第 5 卷, 增刊 3. M. O. Dayhoff (編), 第 345-352 頁, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.；Schwartz, R. M.,等人,「Matrices for detecting distant relationships.」，Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) 第 5 卷, 增刊 3." M. O. Dayhoff (編), 第 353-358 頁, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.；Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565；States, D. J.,等人, (1991) Methods 3:66-70；Henikoff, S.,等人, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919；Altschul, S. F.,等人, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300；ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S.,等人, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268；Karlin, S.,等人, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877；Dembo, A.,等人, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039；以及 Altschul, S. F.「Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments.」，Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai 編), (1997) 第 1-14 頁, Plenum, N.Y.；其全部教導皆併入本文。

【0237】 一些變異體可為多肽在其核醣體合成期間(共翻譯修飾)或之後(翻譯後修飾「PTM」)經歷之共價修飾。通常藉由特定的酶或酶途徑引入 PTM。

許多出現在蛋白質骨架內的特定特徵性蛋白質序列(例如，標籤序列)之位點處。已記錄數百個 PTM，且此等修飾始終會影響蛋白質結構或功能之某些態樣(Walsh, G.「Proteins」(2014) 第二版, 由 Wiley and Sons, Ltd.出版, ISBN: 9780470669853，其全部教導皆併入本文)。在某些例示性實施例中，蛋白質組合物可包含一種以上類型的感興趣之蛋白質之蛋白質變異體。

【0238】 在阿柏西普(及具有阿柏西普結構特徵之蛋白質，例如，阿柏西普之一或多個重鏈或輕鏈區)情況下之蛋白質變異體可包含但不限於可由一或多個在以下各處出現之胺基酸殘基之氧化產生的氧化變異體：例如組胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、苯丙胺酸及/或酪胺酸殘基；可由天冬醯胺殘基處之脫醯胺產生的脫醯胺變異體及/或去氧葡醛酮糖化精胺酸殘基產生之變異體。

【0239】 關於阿柏西普(及具有阿柏西普之結構特徵的蛋白質，例如，阿柏西普之一或多個重鏈或輕鏈區)，氧化變異體可包含在 His86、His110、His145、His209、His95、His19 及/或 His203 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的組胺酸殘基之氧化；在 Trp58 及/或 Trp138 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的色胺酸殘基之氧化；在 Tyr64 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效位置)處的酪胺酸殘基之氧化；在 Phe44 及/或 Phe166 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的苯丙胺酸殘基之氧化；及/或在 Met10、Met20、Met163 及/或 Met192 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的甲硫胺酸殘基之氧化。

【0240】 關於阿柏西普(及具有阿柏西普之結構特徵的蛋白質，例如阿非柏西之一或多個重鏈或輕鏈區)，脫醯胺變異體可包含在 Asn84 及/或 Asn99 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的天冬醯胺殘基之脫醯胺。

【0241】 關於阿柏西普(及具有阿柏西普之結構特徵的蛋白質，例如，阿柏西普之一或多個重鏈或輕鏈區)，去氧葡醛酮糖化變異體可包含在 Arg5 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的精胺酸殘基之 3-去氧葡醛酮糖化。

【0242】　蛋白質變異體可包括酸性種類及鹼性種類。酸性種類係通常比CEX之主峰更早溶析或比AEX之主峰更晚溶析的變異體，而鹼性種類係比CEX之主峰更晚溶析或比AEX之主峰更早溶析的變異體。

【0243】　如本文所用，術語「酸性種類」、「AS」、「酸性區域」及「AR」係指特徵為總酸性電荷的蛋白質變異體。例如，在重組蛋白製劑中，可藉由以下各種方法偵測此等酸性種類，諸如離子交換，例如 WCX-10 HPLC (弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)。抗體之酸性種類可包括變異體、結構變異體及/或片段化變異體。例示性變異體可包括但不限於脫醯胺變異體、岩藻醣化變異體、氧化變異體、甲基乙二醛(MGO)變異體、醣化變異體及檸檬酸變異體。例示性結構變異體包括但不限於醣化變異體及丙酮化變異體。例示性片段化變異體包括由於肽鏈之解離、酶及/或化學修飾而由靶分子產生的任何經修飾之蛋白質種類，包括但不限於 Fc 及 Fab 片段、缺少 Fab 之片段、缺少重鏈可變域之片段、C 端截短變異體、在輕鏈中切除 N 端 Asp 之變異體以及具有輕鏈之 N 端截短的變異體。其他酸性種類變異體包括包含以下各物之變異體：未配對之二硫化物、宿主細胞蛋白及宿主核酸、層析材料及培養基組分。通常，酸性種類在 CEX 期間比主峰更早溶析或在 AEX 分析期間比主峰更晚溶析(參見**圖 16 及圖 17**)。

【0244】　在某些實施例中，蛋白質組合物可包含一種以上類型之酸性種類變異體。例如，但不作為限制，可基於出現的峰之層析滯留時間對總酸性種類進行分類。可將全部酸性種類歸類之另一例子可基於變異體之類型-變異體、結構變異體或片段化變異體。

【0245】　術語「酸性種類」或「AS」不涉及過程相關之雜質。如本文所用，術語「過程相關之雜質」係指存在於包含蛋白質之組合物中但並非衍生自蛋白質本身之雜質。過程相關之雜質包括但不限於宿主細胞蛋白(HCP)、宿主細胞核酸、層析材料及培養基組分。

【0246】　在一例示性實施例中，與感興趣之蛋白質相比，抗 VEGF 組合物中酸性種類之量可為最多約 20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、

0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。抗 VEGF 組合物之實例論述於以下部分 III 中。在一態樣中，抗 VEGF 組合物可包含選自由以下組成之群組的抗 VEGF 蛋白：阿柏西普、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。在一較佳態樣中，感興趣之重組蛋白為阿柏西普。

【0247】 在負責酸性或鹼性種類之化學降解途徑中，蛋白質及肽中最常見的兩種共價修飾為去胺及氧化。甲硫胺酸、半胱胺酸、組胺酸、色胺酸及酪胺酸為最易氧化之胺基酸：Met 及 Cys 係因其硫原子，而 His、Trp 及 Tyr 係因其芳環。

【0248】 如本文所用，術語「氧化種類」、「OS」或「氧化變異體」係指藉由氧化形成的蛋白質變異體。亦可藉由各種方法，諸如離子交換，例如 WCX-10 HPLC (弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)來偵測此等氧化種類。氧化變異體可由在組胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、苯丙胺酸及/或酪胺酸殘基處發生之氧化產生。具體而言，關於阿柏西普(及具有阿柏西普之結構特徵的蛋白質，例如阿柏西普之一或多個重鏈或輕鏈區)，氧化變異體可包含在 His86、His110、His145、His209、His95、His19 及/或 His203 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的組胺酸殘基之氧化；在 Trp58 及/或 Trp138 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的色胺酸殘基之氧化；在 Tyr64 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效位置)處的酪胺酸殘基之氧化；在 Phe44 及/或 Phe166 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的苯丙胺酸殘基之氧化；及/或在 Met10、Met 20、Met163 及/或 Met192 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處的甲硫胺酸殘基之氧化。

【0249】 在一例示性實施例中，與感興趣之蛋白質相比，抗 VEGF 組合物中氧化種類之量可為最多約 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。抗 VEGF

組合物之實例論述於以下部分 III 中。在一態樣中，抗 VEGF 組合物可包含選自由以下組成之群組的抗 VEGF 蛋白：阿柏西普、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。在一較佳態樣中，感興趣之重組蛋白為阿柏西普或 MiniTrap。

【0250】 半胱胺酸殘基可自發氧化形成分子內或分子間二硫鍵或單分子副產物(諸如次磺酸)。

【0251】 組胺酸殘基經由與其咪唑環之反應亦對氧化高度敏感，隨後會生成另外的羥基種類(Li, S, C Schoneich 及 RT. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500，其全部教導皆併入本文)。所提出的組胺酸氧化機制在**圖 2** 及**圖 3** 中突出顯示。詳細機制研究可獲自 Anal. Chem. 2014, 86, 4940-4948 及 J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (2000) 1093-1097，其全部教導皆併入本文。

【0252】 甲硫胺酸之氧化可導致甲硫胺酸亞碸之形成(Li, S, C Schoneich 及 RT. Borchardt.1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500)。甲硫胺酸殘基之各種可能的氧化機制已在文獻中討論(Brot, N., Weissbach, H. 1982. The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. Trends Biochem. Sci. 7: 137-139，其全部教導皆併入本文)。

【0253】 色胺酸之氧化可產生復雜的產物混合物。主要產物可為 N-甲醯基犬尿胺酸及犬尿胺酸以及單氧化、二氧化及/或三氧化產物(**圖 4**)。帶有氧化之 Trp 修飾的肽通常顯示 4、16、32 及 48 Da 之質量增加，對應於形成犬尿胺酸(KYN)、羥基色胺酸(W_{ox1})及 N-甲醯基犬尿胺酸/二羥基色胺酸(NFK/W_{ox2}，亦稱為「雙重氧化之 Trp」)、三羥基色胺酸(W_{ox3}，亦稱為「三重氧化之 Trp」)及其組合，諸如羥基犬尿胺酸(KYN_{ox1}，+20 Da)。氧化為羥基色胺酸(W_{ox1})(Mass spectrometric identification of oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification? J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010 年 7 月; 21(7): 1114-1117，其全部教導皆併入本文)。已發現色胺酸氧化而非甲硫胺酸及組胺酸氧化會在蛋

白質產物中產生顏色變化(Characterization of the Degradation Products of a Color-Changed Monoclonal Antibody: Tryptophan-Derived Chromophores. dx.doi.org/10.1021/ac404218t | Anal. Chem. 2014, 86, 6850−6857)。與色胺酸相似，酪胺酸之氧化主要生成 3,4-二羥基苯丙胺酸(DOPA)及二酪胺酸(Li, S, C Schoneich 及 RT. Borchardt.1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng.48:490-500)。

【0254】 如本文所用，術語「鹼性種類」、「鹼性區域」及「BR」係指蛋白質，例如抗體或其抗原結合部分之變異體，其特徵為相對於蛋白質中存在的初級電荷變異體種類的總鹼性電荷。例如，在重組蛋白製劑中，可藉由各種方法，諸如離子交換，例如 WCX-10 HPLC (弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)偵測此等鹼性種類。例示性變異體可包括但不限於離胺酸變異體、天冬胺酸之異構化、天冬醯胺處之琥珀醯亞胺形成、甲硫胺酸氧化、醯胺化、不完全二硫鍵形成、自絲胺酸至精胺酸之突變、醣化、片段化及聚集。通常，鹼性種類之溶析在 CEX 期間晚於主峰或在 AEX 分析期間早於主峰。(Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. MAbs. 2012 年 9 月 1 日; 4(5): 578–585. doi: 10.4161/mabs.21328，其全部教導皆併入本文。)

【0255】 在某些實施例中，蛋白質組合物可包含一種以上類型之鹼性種類變異體。例如但不限於，可基於出現的峰之層析滯留時間對總鹼性種類進行劃分。可劃分總鹼性種類之另一例子可基於變異體之類型-變異體、結構變異體或片段化變異體。

【0256】 如針對酸性種類所討論，術語「鹼性種類」不包括過程相關之雜質，並且鹼性種類可為產物製備之結果(在本文中稱為「製備來源之鹼性種類」)或儲存之結果(在本文中稱為「儲存來源之鹼性種類」)。

【0257】 在一例示性實施例中，與感興趣之蛋白質相比，抗 VEGF 組合物中鹼性種類之量可為最多約 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、

0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。抗 VEGF 組合物之實例論述於以下部分 III 中。在一態樣中，抗 VEGF 組合物可包含選自由以下組成之群組的抗 VEGF 蛋白：阿柏西普、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。在一較佳態樣中，感興趣之重組蛋白為阿柏西普。

【0258】 如本文所用，「樣本基質」或「生物樣本」可獲自生物製程之任何步驟，諸如細胞培養液(CCF)、收穫的細胞培養液(HCCF)、下游過程中之任何步驟、原料藥(DS)或包含最終調配產物之藥品(DP)。在一些其他特定例示性實施例中，生物樣本可選自澄清、層析產生、病毒失活化或過濾之下游過程的任何步驟。在一些特定例示性實施例中，藥品可選自診所、運輸、儲存或處理中之製造藥品。

【0259】 如本文所用，術語「個體」係指哺乳動物(例如，大鼠、小鼠、貓、狗、奶牛、綿羊、馬、山羊、兔)，較佳為需要預防及/或治療癌症或血管生成性眼部病症之人類。個體可能患有癌症或血管生成性眼部病症，或易患癌症或血管生成性眼部病症。

【0260】 就蛋白質調配物而言，如本文所用，術語「穩定的」係指在本文所定義之例示性條件下儲存後，該調配物內的感興趣之蛋白質能夠保持可接受程度之化學結構或生物功能。即使其中所含的感興趣之蛋白質在儲存限定量之時間後未保持 100%之其化學結構或生物功能，調配物亦可為穩定的。在某些情境下，儲存限定量之時間後保持約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%之蛋白質結構或功能可視為「穩定的」。

【0261】 術語「治療(treat)」或「治療(treatment)」係指逆轉、穩定或消除不希望有的疾病或病症(例如，血管生成性眼部病症或癌症)之治療措施，例如，藉由使該種疾病或病症之一或多種症狀或症候消退、穩定或消除任何臨床可量測之程度(例如，關於血管生成性眼部病症)；藉由使糖尿病性視網膜病嚴重程度評分(DRSS)降低或維持；藉由改善或維持視力(例如，最佳矯正視力，例如，藉由 ETDRS 字母之增加來量度)；增加或維持視野及/或減小或維持中央視網膜厚度；以及就癌症而言，停止或逆轉個體中的癌細胞之生

長、存活及/或轉移。通常，治療措施係向患有疾病或病症之個體投與一或多個劑量之治療有效量之 VEGF MiniTrap。

【0262】 在蛋白質製備之情形下，如本文所用，術語「上游製程技術」係指涉及在感興趣之蛋白質的細胞培養期間或之後由細胞產生蛋白質及收集蛋白質的活動。如本文所用，術語「細胞培養」係指用於產生及維持能夠產生感興趣之重組蛋白的宿主細胞群之方法，以及用於最佳化感興趣之蛋白質的產生及收集之方法及技術。例如，一旦將表現載體併入合適的宿主細胞中，則可將宿主細胞維持在適於相關核苷酸編碼序列之表現以及所需重組蛋白之收集及產生的條件下。

【0263】 當使用本發明之細胞培養技術時，感興趣之蛋白質可在胞內、在周質空間中產生，或直接分泌至培養基中。在胞內產生感興趣之蛋白質的實施例中，可藉由包括但不限於離心或超濾之多種方式移除微粒片段-宿主細胞或溶解之細胞(例如，由均質化產生之片段)。當感興趣之蛋白質分泌至培養基中時，可首先使用市售之蛋白質濃縮過濾器(例如，使用 Amicon™或 Millipore Pellicon™超濾單元)濃縮來自此等表現系統之上清液。在一態樣中，可藉由離心，繼之深度過濾，隨後親和力捕獲層析來收獲感興趣之蛋白質。

【0264】 如本文所用，「VEGF 拮抗劑」為與 VEGF 結合或相互作用之任何蛋白質或肽。通常，這種與 VEGF 之結合或相互作用會抑制 VEGF 與其受體(VEGFR1 及 VEGFR2)之結合，及/或抑制 VEGF 之生物信號傳導及活性。VEGF 拮抗劑包括干擾 VEGF 與天然 VEGF 受體之間的相互作用之分子，例如，與 VEGF 或 VEGF 受體結合並阻止或以其他方式阻礙 VEGF 與 VEGF 受體之間的相互作用之分子。特定的例示性 VEGF 拮抗劑包括抗 VEGF 抗體(例如蘭尼單抗[LUCENTIS®])、抗 VEGF 受體抗體(例如，抗 VEGFR1 抗體、抗 VEGFR2 抗體及其類似物)、以及基於 VEGF 受體之嵌合分子或 VEGF 抑制融合蛋白(在本文中亦稱為「VEGF-Trap」或「VEGF MiniTrap」)，諸如阿柏西普、ziv-阿柏西普及具有 SEQ ID NO.: 60 之胺基酸的蛋白質。VEGF-Trap 之其他實例為 ALT-L9、M710、FYB203 及 CHS-2020。VEGF-Trap 之額外實例可見於美國專利第 7,070,959 號；第 7,306,799 號；第 7,374,757 號；第

7,374,758 號；第 7,531,173 號；第 7,608,261 號；第 5,952,199 號；第 6,100,071 號；第 6,383,486 號；第 6,897,294 號及第 7,771,721 號中，此等專利具體地以引用之方式全部併入本文。

【0265】 基於 VEGF 受體之嵌合分子包括嵌合多肽，其包含 VEGF 受體諸如 VEGFR1 (亦稱為 Flt1)及/或 VEGFR2 (亦稱為 Flk1 或 KDR)之兩個或更多個免疫球蛋白(Ig)樣域，並且亦可包含多聚域(例如，促進兩種或更多種嵌合多肽之多聚化[例如，二聚化]的 Fc 域)。例示性的基於 VEGF 受體之嵌合分子係稱為 VEGFR1R2-FcΔC1(a)之分子(亦稱為阿柏西普；以商品名 EYLEA® 出售)。在某些例示性實施例中，阿柏西普包含如下所列之胺基酸序列：

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDV
VLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR
DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRV
HEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。(SEQ ID NO.: 55)。

【0266】 如本文所用，「病毒過濾」可包括使用合適的過濾器進行過濾，該等過濾器包括但不限於來自 Asahi Kasei Pharma 之 Planova 20N™、50 N 或 BioEx；來自 EMD Millipore 之 Viresolve™過濾器；來自 Sartorius 之 ViroSart CPV；或來自 Pall Corporation 之 Ultipor DV20 或 DV50™過濾器。對於熟習此項技術之普通技術人員顯而易見的是，選擇合適的過濾器以獲得所需過濾性能。

II. 顏色測定

【0267】 如本文所用，可藉由各種方法來量測在重組蛋白，特別是抗 VEGF 蛋白之產生期間觀察到的顏色。非限制性實例包括使用碘色號、黑曾(hazen)色號、加德納(gardner)色號、洛維邦德(lovibond)色號、賽氏(Saybolt)色號、礦物油色號、歐洲藥典色號、美國藥典色號、CIE L*, a*, b* (或 CIELAB)、

凱爾特(Klett)色號、Hess-Ives 色號、黃度指數、ADMI 色號以及 ASBC 及 EBC 啤酒色號。有關此等標度之詳情可見於 Lange 之申請報告第 3.9e 號中，其全部教導皆併入本文。

【0268】 基於歐洲藥典(Ph Eur)(歐洲顏色標準，參見 European Pharmacopoeia. 第 2.2.2 章 Degree of coloration of liquids. 第 8 版 EP，其全部教導皆併入本文)之視覺色彩匹配可包括製備如下中所述之顏色參考溶液：Ph. Eur. (EP 2.2.2. Degree of Coloration of Liquids 2)-製備紅色(氯化鈷(II))、黃色(氯化亞鐵(III))及藍色(硫酸亞銅(II))之三種母液以及 1%鹽酸，黃色(Y)、綠黃色(GY)、棕黃色(BY)、棕色(B)及紅色(R)色相之五種顏色參考溶液。依次使用這五種參考溶液，總共製備三十七種顏色參考溶液(Y1-Y7、GY1-GY7、BY1-BY7、B1-B9 及 R1-R7)。每個參考溶液皆在 CIE-Lab 色彩空間中由例如明度、色相及色度明確定義。在七個黃棕色標準(BY 標準)中，BY1 為最暗標準，而 BY7 為最不暗標準。給定樣本與 BY 顏色標準之匹配通常係在漫射日光下完成。歐洲黃棕色顏色標準之組成在下表 1 中描述。

表 1. 歐洲棕黃色標準之組成

參考溶液	體積(mL)	
	標準溶液 BY	鹽酸(10g/1 HCl)
BY1	100.0	0.0
BY2	75.0	25.0
BY3	50.0	50.0
BY4	25.0	75.0
BY5	12.5	87.5
BY6	5.0	95.0
BY7	2.5	97.5

棕黃色標準溶液(BY)：10.8 g/L $FeCl_3.6H_2O$、6.0 g/L $CoCl_2.6H_2O$ 及 2.5 g/L $CuSO_4.5H_2O$

【0269】 液體顏色之測試係藉由將測試溶液與標準顏色溶液進行比較來進行。根據測試溶液顏色之色相及強度來選擇標準顏色溶液之組成。通常，比較係在無色、透明、中性玻璃之平底試管中進行，該試管之內徑及所有其他態樣皆應儘可能匹配(例如，直徑約為 12、15、16 或 25 mm 之試管)。例如，比較可在 2 或 10 mL 之測試溶液與標準顏色溶液之間進行。液體之深度例如可為約 15、25、40 或 50 mm。分配給測試溶液之顏色不應比標準顏色更強

烈。顏色比較通常係在針對白色背景之漫射光(例如，日光)下進行。可沿試管之垂直軸或水平軸比較顏色。

【0270】 與 EP 顏色量測對比，USP Monograph 1061 Color – Instrumental Measurement 引用 CIE L*, a*, b* (或 CIELAB)顏色量測之使用以便精確及客觀地量化顏色。在美國藥典中定義總共二十種顏色參考溶液(依次由字母 A 至 T 識別)。所量測樣本之顏色自動與顏色參考溶液相關。這意味著展示最接近樣本之顏色參考溶液(亦即，與樣本顏色具有最小色差 ΔE*之參考溶液)。ΔL*、Δa*及 Δb*值給出樣本之 L*、a*及 b*值與所示 USP 溶液之 L*、a*及 b*值之間的定量差異。CIE L*a*b*坐標系，L*代表顏色之明度，標度為 0–100，其中 0 為最暗且 100 為最亮；a*代表顏色之紅度或綠度(正值 a*代表紅色，而負值 a*代表綠色)，且 b*代表樣本之黃度或藍度，其中正值 b*代表黃色，而負值 b*代表藍色。與標準或評估中之初始樣本的顏色差異可藉由個別顏色組分之變化 ΔL*、Δa*及 Δb*來表示。複合變化或顏色差異可使用下式來計算作為空間中之簡單歐氏距離(Euclidian distance)：$dE^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$。可例如使用 Hunter Labs UltrascanPro (Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia)或 BYK Gardner LCS IV (BYK-Gardner, Columbia, Maryland)生成 CIE L*, a*, b*顏色坐標。對於 Hunter Labs UltraScan Pro，可執行 Didymium Filter Test 以用於波長校準。儀器在使用前可在具有 0.780 吋端口插件及 DIW 之 TTRAN 中標準化；因此，使用光阱及黑卡建立光度標度之頂部(L = 100)及底部(L = 0)。參見 Pack 等人, Modernization of Physical Appearance and Solution Color Tests Using Quantitative Tristimulus Colorimetry: Advantages, Harmonization, and Validation Strategies, J. Pharmaceutical Sci. 104: 3299-3313 (2015)，其全部教導皆併入本文。BY 標準之顏色亦可在 CIE L*, a*, b*顏色空間(「CIELAB」或「CIELab」顏色空間)下表示。參見**表 2**。

表 2. CIE L*, a*, b*顏色空間中歐洲棕黃色顏色標準之表徵

標準	L*^	a*^	b*^	L*~	a*~	b*~
BY1	93.95	-2.76	28.55	92.84	-3.16	31.15
BY2	94.76	-2.96	22.69	94.25	-3.77	26.28

BY3	96.47	-2.84	16.41	95.92	-3.44	18.52
BY4	97.17	-1.94	9.07	97.67	-2.63	10.70
BY5	98.91	-1.19	4.73	98.75	-1.61	5.77
BY6	99.47	-0.59	2.09	99.47	-0.71	2.38
BY7	99.37	-0.31	1.13	99.71	-0.37	1.17

^由 Pack 等人報告

~ 本文中以實驗方式量測- L^*及 b^*值，針對每個 BY 顏色標準

【0271】 為了對顏色檢定進行高通量篩選，與 BY 顏色標準相比，分光光度檢定法(CIELAB)為更適合及更具量化性之量測。如實例部分所述，進一步最佳化替代檢定。

【0272】 對於評估顏色之任何樣本，必須針對樣本中之蛋白質濃度標準化測試樣本之蛋白質濃度，例如 5 g/L、10 g/L 及其類似濃度用於比較。

III. 抗 VEGF 組合物

【0273】 調節 VEGF 信號傳導途徑的 VEGF 蛋白質家族中有至少有五個成員：VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及胎盤生長因子(PlGF)。抗 VEGF 組合物可包含 VEGF 拮抗劑，其與 VEGF 蛋白質家族之一或多個成員特異性相互作用，並且抑制其一或多種生物活性，例如其促有絲分裂、血管生成及/或血管通透性活性。

【0274】 在一實施例中，產生抗 VEGF 蛋白之方法包含：(a)提供經基因工程改造以表現抗 VEGF 蛋白之宿主細胞；(b)在適於細胞表現抗 VEGF 蛋白之條件下在 CDM 中培養宿主細胞；及(c)收穫由細胞產生的抗 VEGF 蛋白之製劑。在一態樣中，抗 VEGF 蛋白係選自由以下組成之群：阿柏西普、重組 MiniTrap (其實例在美國專利第 7,279,159 號中揭示)、scFv 及其他抗 VEGF 蛋白。在一較佳態樣中，感興趣之重組蛋白為阿柏西普。

【0275】 發明者發現，在某些 CDM 中製造抗 VEGF 蛋白(例如，阿柏西普)產生表現出獨特顏色之生物樣本。在不同製造步驟中且甚至在包含抗 VEGF 蛋白之最終調配物中皆觀察到不同顏色特性。如實例 9 中所觀察，為了產生 VEGF MiniTrap，在 CDM 中培養細胞產生具有強烈的黃棕色之抗 VEGF 蛋白(例如，阿柏西普)。收穫後的親和力捕獲步驟亦產生顯示出某種顏色-黃棕色之析出液。使用 AEX 之其他產生步驟亦顯示出黃棕色，但強度降低。

【0276】 如下文中更詳細地描述，顏色可使用以下手段來評估：(i)歐洲顏色標準 BY，其中進行定性目視檢查；或(ii)比色檢定，CIELAB，其比 BY 系統更具量化性。然而，無論哪種情況，皆應針對蛋白質濃度將多個樣本之間的顏色評估進行歸一化，以確保有意義之評估/比較。例如，參看實例 9，特別是**表 9-2**，蛋白 A 析出液具有約 2.52 之 b*值，大致相當於 BY5 之 BY 值(在蛋白 A 析出液中以 5 g/L 之蛋白質濃度量測時)。若要將蛋白 A 析出液之顏色與另一樣本進行比較，則應使用相同的蛋白質濃度進行該比較。因此，將蛋白 A 析出液與具有約 0.74 之 b*值(在蛋白 A 析出液中以 5 g/L 之蛋白質濃度量測時)的 AEX 池相比較，產生方法顯示在 AEX 層析之後，樣本之黃棕色自蛋白 A 析出液至 AEX 池之實質性減弱。

【0277】 本發明之組合物之特徵可為如本文所討論之黃棕色，例如，不比歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有 b*值 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 之抗 VEGF 蛋白或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白，且其中組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。

【0278】 在一實施例中，使用 CDM 產生的本發明之組合物產生具有明顯黃棕色之生物樣本，其中該樣本可藉由公認的標準顏色表徵來表徵：

(i) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY2；

(ii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY3；

(iii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY4；

(iv) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY5；

(v) 介於歐洲顏色標準 BY2 與 BY3 之間；

(vi) 介於歐洲顏色標準 BY3 與 BY4 之間；

(vii) 介於歐洲顏色標準 BY4 與 BY5 之間，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白且其中組合物係自經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。

【0279】 在另一實施例中，使用 CDM 產生的本發明之組合物產生具有明顯黃棕色之生物樣本，其中該組合物藉由 CIELAB 標度中公認的標準顏色表徵來表徵：

(i) 黃棕色不超過約 22-23 之 b*值；

(ii) 黃棕色不超過約 16-17 之 b*值；

(iii) 黃棕色不超過 9-10 之 b*值；

(iv) 黃棕色不超過 4-5 之 b*值；

(v) 黃棕色不超過 2-3 之 b*值；

(vi) 介於 17-23 之間的 b*值；

(vii) 介於 10-17 之間的 b*值；

(viii) 介於 5-10 之間的 b*值；

(ix) 介於 3-5 之間的 b*值；或

(x) 介於 1-3 之間的 b*值，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白且其中組合物係自經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。

【0280】 在一實施例中，使用 CDM 產生的本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白之其他種類或變異體。此等變異體包括抗 VEGF 蛋白同功型，其包含一或多個氧化之胺基酸殘基，該等同功型總稱為側氧基變異體。此等包含抗 VEGF 蛋白及其側氧基變異體之組合物的酶消化物可包含以下一或多者：

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)，其包含約 0.004-0.013%之 2-側氧基-組胺酸，

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)，其包含約 0.006-0.028%之 2-側氧基-組胺酸，

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)，其包含約 0.049-0.085%之 2-側氧基-組胺酸，

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)，其包含約 0.057-0.092%之 2-側氧基-組胺酸，

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)，其包含約 0.008-0.022%之 2-側氧基-組胺酸，及/或

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56) ，其包含約 0.185-0.298%之二氧化色胺酸；

或

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)，其包含約 0.008%之 2-側氧基-組胺酸，

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)，其包含約 0.02%之 2-側氧基-組胺酸，

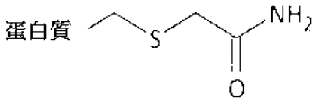
TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20) ，其包含約 0.06%之 2-側氧基-組胺酸，

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)，其包含約 0.07%之 2-側氧基-組胺酸，

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)，其包含約 0.01%之 2-側氧基-組胺酸，及/或 IIWDSR (SEQ ID NO.: 56)，其包含約 0.23%之二-側氧基-色胺酸，其中 H*為可經氧化成 2-側氧基-組胺酸之組胺酸，且其中 C*為可經羧甲基化之半胱胺酸。在一具體實施例中，抗 VEGF 蛋白為阿柏西普(aflibercept)。在另一實施例中，抗 VEGF 蛋白為 VEGF MiniTrap。

【0281】 在本發明之一例示性實施例中，本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白，其中抗 VEGF 蛋白中不多於約 1%、不多於約 0.1%或約 0.1-1%、0.2-1%、0.3-1%、0.4-1%、0.5-1%、0.6-1%、0.7-1%、0.8-1%或 0.9-1%之組胺酸殘基為 2-側氧基-組胺酸。在此等組合物中，可存在抗 VEGF 蛋白變異體之異質群體，每個變異體具有不同量之 2-側氧基-組胺酸殘基及未氧化之組胺酸殘基。因此，組合物中的 2-側氧基-組胺酸抗 VEGF 蛋白之百分比係指抗 VEGF 分子中的位點特異性 2-側氧基-組胺酸除以抗 VEGF 蛋白分子中的總位點特異性組胺酸(氧化加未氧化)乘以 100。定量組合物中的 2-側氧基-組胺酸水準之一種方法係用蛋白酶(例如，Lys-C 及/或胰蛋白酶)消化多肽及藉由例如質譜(ms)分析所得肽中的 2-側氧基-組胺酸之量。

【0282】 在消化抗 VEGF 蛋白之前，半胱胺酸巯基藉由與碘乙醯胺(IAM)之反應經阻斷，產生由以下化學結構表示之殘基：



。該修飾保護遊離硫醇免於重整二硫橋，並防止二硫鍵加擾。本發明包括包含抗 VEGF 蛋白及其變異體之組合物(例如，水性組合物)，當用 IAM 修飾並用蛋白酶(例如，Lys-C 及胰蛋白酶)消化並藉由質譜進行分析時，其包含以下肽：

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)，其包含約 0.004-0.013%之 2-側氧基-組胺酸，

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)，其包含約 0.006-0.028%之 2-側氧基-組胺酸，

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)，其包含約 0.049-0.085%之 2-側氧基-組胺酸，

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)，其包含約 0.057-0.092%之 2-側氧基-組胺酸，

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)，其包含約 0.008-0.022%之 2-側氧基-組胺酸，及/或

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56)，其包含約 0.185-0.298%之二氧化之色胺酸；

或

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)，其包含約 0.008%之 2-側氧基-組胺酸，

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)，其包含約 0.02%之 2-側氧基-組胺酸，

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)，其包含約 0.06%之 2-側氧基-組胺酸，

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)，其包含約 0.07%之 2-側氧基-組胺酸，

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)，其包含約 0.01%之 2-側氧基-組胺酸，及/或

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56)，其包含約 0.23%之二-側氧基-色胺酸，

其中 H*為 2-側氧基-組胺酸，且其中 C*為羧甲基化之半胱胺酸。在本發明之一實施例中，將肽用 PNGase F 去醣化。

【0283】　本發明包括包含抗 VEGF 蛋白之組合物，其中抗 VEGF 蛋白中所有組胺酸之約 0.1%-10%經修飾為 2-側氧基-組胺酸。此外，組合物之顏色不比例如歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，替代地，具有如使用 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF

蛋白。組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。當使收穫物材料經歷捕獲層析程序時，可自經澄清之收穫物中獲得該等組合物。在一態樣中，捕獲步驟為使用例如蛋白 A 親和力管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析親和樣本時，可偵測到一或多種變異體。

【0284】　本發明包括包含抗 VEGF 蛋白之組合物，其中抗 VEGF 蛋白中所有色胺酸之約 0.1%-10%經修飾為犬尿胺酸。此外，組合物之顏色不比歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如使用 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 之抗 VEGF 蛋白或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。當經歷捕獲層析程序時，此等組合物可自經澄清之收穫物中獲得。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 親和力管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析親和力樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0285】　本發明包括包含抗 VEGF 蛋白之組合物，其中抗 VEGF 蛋白中所有色胺酸之約 0.1%-10%經修飾為單羥基色胺酸。此外，組合物之顏色不比歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如藉由 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 之抗 VEGF 蛋白或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。當經歷捕獲層析程序時，此等組合物可自經澄清之收穫物中獲得。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 親和力管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析由親和力步驟中提取之樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0286】　本發明包括包含抗 VEGF 蛋白之組合物，其中抗 VEGF 蛋白中所有色胺酸之約 0.1%-10%經修飾為二羥基色胺酸。此外，顏色不比歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如使用 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 之抗 VEGF 蛋白或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。

組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。該等組合物可由使用包含抗 VEGF 蛋白及其側氧基變異體之 CDM 製成的經澄清之收穫物中獲得，該經澄清之收穫物經歷捕獲層析程序。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 親和力管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析由親和步驟中提取之樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0287】 本發明包括包含抗 VEGF 蛋白之組合物，其中抗 VEGF 蛋白中所有色胺酸之約 0.1%-10%經修飾為三羥基色胺酸。此外，組合物之顏色不比歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如藉由 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 之抗 VEGF 蛋白或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。組合物係自經澄清之收穫物或經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。此等組合物可使用捕獲層析獲得。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 親和力管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析由親和中提取之樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0288】 在一實施例中，本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白，其中抗 VEGF 蛋白可包含如下一或多個殘基之修飾：一或多個天冬醯胺經脫醯胺；一或多個天冬胺酸轉化為異天冬胺酸及/或 Asn；一或多個甲硫胺酸經氧化；一或多個色胺酸轉化為 N-甲醯基犬尿胺酸；一或多個色胺酸為單羥基色胺酸；一或多個色胺酸為二羥基色胺酸；一或多個色胺酸為三羥基色胺酸；一或多個精胺酸轉化為 Arg 3-去氧葡醛酮糖；C 端甘胺酸不存在；及/或存在一或多個非醣化糖位點。

【0289】 此等組合物可自使用包含抗 VEGF 蛋白及其變異體之 CDM 製成的經澄清之收穫物中獲得，該經澄清之收穫物經歷例如捕獲層析程序。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序。當使用例如液相層析-質譜法(LC-MS)分析由親和步驟中提取之樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0290】 在一例示性實施例中，本發明之組合物可包含具有阿柏西普之結構特徵的抗 VEGF 蛋白，其可在以下一或多者處經氧化：His86、His110、

His145、His209、His95、His19 及/或 His203 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)；Trp58 及/或 Trp138 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)；Tyr64 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效位置)；Phe44 及/或 Phe166 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)；及/或 Met10、Met 20、Met163 及/或 Met192 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)。此等組合物可自使用包含阿柏西普及其側氧基變異體之 CDM 製成的經澄清之收穫物中獲得，該經澄清之收穫物經歷捕獲層析程序。捕獲步驟可為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序。當使用例如液相層析-質譜法(LC-MS)分析由親和步驟中提取之樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0291】 在一實施例中，本發明之組合物可包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO.: 46 之 VEGF MiniTrap，其可在以下各處經氧化：His86、His110、His145、His209、His95、His19 及/或 His203；Trp58 及/或 Trp138；Tyr64；Phe44 及/或 Phe166；及/或 Met10、Met 20、Met163 及/或 Met192。此等組合物可自使用包含 VEGF MiniTrap 及其側氧基變異體之 CDM 製成的經澄清之收穫物中獲得，該經澄清之收穫物經歷捕獲層析程序。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序-當使用液相層析-質譜法(LC-MS)進行分析時，可偵測到一或多種此等變異體。

【0292】 在一些例示性實施例中，本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其變異體(包括側氧基變異體)，其中組合物中的蛋白質變異體之量為最多約 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。此等組合物可自使用包含抗 VEGF 蛋白及其變異體之 CDM 製成的經澄清之收穫物中獲得，該經澄清之收穫物經歷捕獲層析程序。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序-當使用液相層析-質譜法(LC-MS)進行分析時，可偵測到一或多種此等變異體。在一態樣中，此一組合物之顏色不比例如歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強

烈，及/或具有如藉由 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。

【0293】 在其他例示性實施例中，本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其變異體，其中組合物中的蛋白質變異體之量為約 0%至約 20%，例如，約 0%至約 20%、約 0.05%至約 20%、約 0.1%至約 20%、約 0.2%至約 20%、約 0.3%至約 20%、約 0.4%至約 20%、約 0.5%至約 20%、約 0.6%至約 20%、約 0.7%至約 20%、約 0.8%至約 20%、約 0.9%至約 20%、約 1%至約 20%、約 1.5%至約 20%、約 2%至約 20%、約 3%至約 20%、約 4%至約 20%、約 5%至約 20%、約 6%至約 20%、約 7%至約 20%、約 8%至約 20%、約 9%至約 20%、約 10%至約 20%、約 0%至約 10% 、約 0.05%至約 10%、約 0.1%至約 10%、約 0.2%至約 10%、約 0.3%至約 10%、約 0.4%至約 10%、約 0.5%至約 10%、約 0.6%至約 10%、約 0.7%至約 10%、約 0.8%至約 10%、約 0.9%至約 10%、約 1%至約 10%、約 1.5%至約 10%、約 2%至約 10%、約 3%至約 10%、約 4%至約 10%、約 5%至約 10%、約 6%至約 10%、約 7%至約 10%、約 8%至約 10%、約 9%至約 10%、約 0%至約 7.5%、約 0.05%至約 7.5%、約 0.1%至約 7.5%、約 0.2%至約 7.5%、約 0.3%至約 7.5%、約 0.4%至約 7.5%、約 0.5%至約 7.5%、約 0.6%至約 7.5%、約 0.7%至約 7.5%、約 0.8%至約 7.5%、約 0.9%至約 7.5%、約 1%至約 7.5%、約 1.5%至約 7.5%、約 2%至約 7.5%、約 3%至約 7.5%、約 4%至約 7.5%、約 5%至約 7.5%、約 6%至約 7.5%、約 7%至約 7.5%、約 0%至約 5%、約 0.05%至約 5%、約 0.1%至約 5%、約 0.2%至約 5%、約 0.3%至約 5%、約 0.4%至約 5%、約 0.5%至約 5%、約 0.6%至約 5%、約 0.7%至約 5%、約 0.8%至約 5%、約 0.9%至約 5%、約 1%至約 5%、約 1.5%至約 5%、約 2%至約 5%、約 3%至約 5%、約 4%至約 5%，以及在上述一或多者內之範圍。此等組合物可藉由對收穫物樣本進行捕獲層析而獲得。捕獲步驟為使用例如蛋白 A 管柱之親和力層析程序。當使用液相層析-質譜法(LC-MS)分析樣本時，可偵測到一或多種此等變異體。在一態樣中，此一組合物之顏色不比例如歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如藉由 CIE L*, a*, b*所表徵之以

下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白。

【0294】 在一實施例中，本發明之組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括其酸性種類，其中組合物中的酸性種類之量可為約 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。如前述所討論，此等酸性種類可藉由各種方法，諸如離子交換，例如，WCX (WCX-10 HPLC，弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)來偵測。通常，酸性種類之溶析在 CEX 期間早於主峰或在 AEX 分析期間晚於主峰(*參見***圖 16** 及**圖 17**)。包含酸性種類之組合物可使用離子交換層析由生物材料(諸如收穫物或親和產生之材料)獲得。

【0295】 在一態樣中，此一組合物之顏色不比例如歐洲棕黃色顏色標準 BY2-BY3、BY3-BY4、BY4-BY5 或 BY5-BY6 暗/強烈，及/或具有如藉由 CIE L*, a*, b*所表徵之以下 b*值：約 17-23、10-17、5-10、3-5 或 1-3，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L。作為實例，參看**圖 16** 及**圖 17**，級分 F1 及 F2 代表包含大部分酸性種類之酸性級分。**圖 17** 中的 MT1 之峰 1 及 2 包含酸性種類，並且級分 F1 及 F2 包含大部分酸性級分。與其他級分相比，包含此等酸性種類之級分(F1 及 F2)亦顯示出黃棕色(**圖 18B** 及**圖 18C**)。

【0296】 在另一實施例中，本發明之組合物包含抗 VEGF 蛋白，包括其酸性種類，其中組合物中的酸性種類之量可為約 0%至約 20%，例如，約 0%至約 20%、約 0.05%至約 20%、約 0.1%至約 20%、約 0.2%至約 20%、約 0.3%至約 20%、約 0.4%至約 20%、約 0.5%至約 20%、約 0.6%至約 20%、約 0.7%至約 20%、約 0.8%至約 20%、約 0.9%至約 20%、約 1%至約 20%、約 1.5%至約 20%、約 2%至約 20%、約 3%至約 20%、約 4%至約 20%、約 5%至約 20%、約 6%至約 20%、約 7%至約 20%、約 8%至約 20%、約 9%至約 20%、約 10%至約 20%、約 0%至約 10%、約 0.05%至約 10%、約 0.1%至約 10%、約 0.2%至約 10%、約 0.3%至約 10%、約 0.4%至約 10%、約 0.5%至約 10%、約 0.6%至約 10%、約 0.7%至約 10%、約 0.8%至約 10%、約 0.9%至約 10%、

約 1%至約 10%、約 1.5%至約 10%、約 2%至約 10%、約 3%至約 10%、約 4%至約 10%、約 5%至約 10%、約 6%至約 10%、約 7%至約 10%、約 8%至約 10%、約 9%至約 10%、約 0%至約 7.5%、約 0.05%至約 7.5%、約 0.1%至約 7.5%、約 0.2%至約 7.5%、約 0.3%至約 7.5%、約 0.4%至約 7.5%、約 0.5%至至約 7.5%、約 0.6%至約 7.5%、約 0.7%至約 7.5%、約 0.8%至約 7.5%、約 0.9%至約 7.5%、約 1%至約 7.5%、約 1.5%至約 7.5%、約 2%至約 7.5%、約 3%至約 7.5%、約 4%至約 7.5%、約 5%至約 7.5%、約 6%至約 7.5%、約 7%至約 7.5%、約 0%至約 5%、約 0.05%至約 5%、約 0.1%至約 5%、約 0.2%至約 5%、約 0.3%至約 5%、約 0.4%至約 5%、約 0.5%至約 5%、約 0.6%至約 5%、約 0.7%至約 5%、約 0.8%至約 5%、約 0.9%至約 5%、約 1%至約 5%、約 1.5%至約 5%、約 2%至約 5%、約 3%至約 5%、約 4%至約 5%，以及在上述一或多者內之範圍。如上所述，可藉由各種方法，諸如離子交換，例如 WCX (WCX-10 HPLC，弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)來偵測此等酸性種類。典型地，酸性種類之溶析在 CEX 期間早於主峰或在 AEX 分析期間晚於主峰(*參見*圖 16 及圖 17)。

【0297】 使用陽離子交換管柱，將感興趣之主峰之前溶析的所有峰累加為酸性區域，而感興趣之蛋白後溶析的所有峰累加為鹼性區域。在例示性實施例中，基於峰之一定滯留時間及所用離子交換管柱，可將酸性種類溶析為兩個或更多個酸性區域，並且可經編號為 AR1、AR2、AR3 等等。

【0298】 在一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括酸性種類，其中 AR1 為 20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括其酸性種類，其中 AR1 為約 0.0%至約 10%、約 0.0%至約 5%、約 0.0%至約 4%、約 0.0%至約 3%、約 0.0%至約 2%、約 3%至約 5%、約 5%至約 8%、或約 8%至約 10%、或約 10%至約 15%，以及在上述一或多者內之範圍。如上所述，可藉由各種方法，諸如離子交換，例如 WCX (WCX-10 HPLC，弱陽離子交換層析)或 IEF (等電聚焦)來偵測此

等酸性區域。通常，酸性種類之溶析在 CEX 期間早於主峰或在 AEX 分析期間晚於主峰(參見**圖 16** 及**圖 17**)。

【0299】　在另一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括酸性種類，其中 AR2 為 20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括酸性種類，其中 AR2 為約 0.0%至約 10%、約 0.0%至約 5%、約 0.0%至約 4%、約 0.0%至約 3%、約 0.0%至約 2%、約 3%至約 5%、約 5%至約 8%、或約 8%至約 10%、或約 10%至約 15%，以及在上述一或多者內之範圍。

【0300】　在一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括鹼性種類，其中組合物中的鹼性種類之量可為最多約 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其鹼性種類，其中與抗 VEGF 蛋白相比，組合物中的鹼性種類之量可為 0%至約 20%，*例如*，約 0%至約 20%、約 0.05%至約 20%、約 0.1%至約 20%、約 0.2%至約 20%、約 0.3%至約 20%、約 0.4%至約 20%、約 0.5%至約 20%、約 0.6%至約 20%、約 0.7%至約 20%、約 0.8%至約 20%、約 0.9%至約 20%、約 1%至約 20%、約 1.5%至約 20%、約 2%至約 20%、約 3%至約 20%、約 4%至約 20%、約 5%至約 20%、約 6%至約 20%、約 7%至約 20%、約 8%至約 20%、約 9%至約 20%、約 10%至約 20%、約 0%至約 10%、約 0.05%至約 10%、約 0.1%至約 10%、約 0.2%至約 10%、約 0.3%至約 10%、約 0.4%至約 10%、約 0.5%至約 10%、約 0.6%至約 10%、約 0.7%至約 10%、約 0.8%至約 10%、約 0.9%至約 10%、約 1%至約 10%、約 1.5%至約 10%、約 2%至約 10%、約 3%至約 10%、約 4%至約 10%、約 5%至約 10%、約 6%至約 10%、約 7%至約 10%、約 8%至約 10%、約 9%至約 10%、約 0%至約 7.5%、約 0.05%至約

7.5%、約 0.1%至約 7.5%、約 0.2%至約 7.5%、約 0.3%至約 7.5%、約 0.4%至約 7.5%、約 0.5%至約 7.5%、約 0.6%至約 7.5%、約 0.7%至約 7.5%、約 0.8%至約 7.5%、約 0.9%至約 7.5%、約 1%至約 7.5%、約 1.5%至約 7.5%、約 2%至約 7.5%、約 3%至約 7.5%、約 4%至約 7.5%、約 5%至約 7.5%、約 6%至約 7.5%、約 7%至約 7.5%、約 0%至約 5%、約 0.05%至約 5%、約 0.1%至約 5%、約 0.2%至約 5%、約 0.3%至約 5%、約 0.4%至約 5%、約 0.5%至約 5%、約 0.6%至約 5%、約 0.7%至約 5%、約 0.8%至約 5%、約 0.9%至約 5%、約 1%至約 5%、約 1.5%至約 5%、約 2%至約 5%、約 3%至約 5%、約 4%至約 5%，以及在上述一或多者內之範圍。

【0301】　可將鹼性種類溶析為兩個或更多個鹼性區域，並且可根據峰之一定滯留時間及所用離子交換將其編號為 BR1、BR2、BR3 等等。

【0302】　在一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，包括其鹼性種類，其中 BR1 為 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其鹼性種類，其中 BR1 為約 0.0%至約 10%、約 0.0%至約 5%、約 0.0%至約 4%、約 0.0%至約 3%、約 0.0%至約 2%、約 3%至約 5%、約 5%至約 8%、或約 8%至約 10%、或約 10%至約 15%，以及在上述一或多者內之範圍。

【0303】　在另一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其鹼性種類，其中 BR2 為 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及抗 VEGF 蛋白之其鹼性種類，其中 BR2 為約 0.0%至約 10%、約 0.0%至約 5%、約 0.0%至約 4%、約 0.0%至約 3%、約 0.0%至約 2%、約 3%至約 5%、約 5%至約 8%、或約 8%至約 10%、或約 10%至約 15%，以及在上述一或多者內之範圍。

【0304】 在另一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及其鹼性種類，其中 BR3 為 15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或 0.0%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白及抗 VEGF 蛋白之其鹼性種類，其中 BR3 為約 0.0%至約 10%、約 0.0%至約 5%、約 0.0%至約 4%、約 0.0%至約 3%、約 0.0%至約 2%、約 3%至約 5%、約 5%至約 8%、或約 8%至約 10%、或約 10%至約 15%，以及在上述一或多者內之範圍。

阿柏西普之光誘導氧化

【0305】 除了發現使用 CDM 產生的抗 VEGF 蛋白組合物之不同顏色特徵或變異體之外，發明者亦發現可在實驗室中藉由暴露於光來人工產生此等組合物。

【0306】 可藉由使抗 VEGF 蛋白暴露於冷白光或紫外光來產生抗 VEGF 組合物的經修飾(包括經氧化)之變異體。在一態樣中，與樣本相比，抗 VEGF 組合物可包含一或多種經修飾之寡肽約 1.5 至約 50 倍之增加，其中該等寡肽係選自由以下組成之群組：

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)、EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)、QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)、TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)、TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22)、VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23)、SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)、SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65)、TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66)、SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67)、IIW*DSR/RIIW*DSR/IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 28)、TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)、GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69)、KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)、F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32)，其中 H*為經氧化為 2-側氧基-組胺酸之組胺酸，其中 C*為經羧甲基化之半胱胺酸，其中 M*為經氧化之甲硫胺酸，其中 W*為經氧化之色胺酸，

其中 Y*為經氧化之酪胺酸，且其中 F*為經氧化之苯丙胺酸。在又一態樣中，藉由使抗 VEGF 組合物暴露於冷白光一段時間，例如約 30 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種經修飾之寡肽約 1.5 至約 10 倍之增加。在另一態樣中，藉由使樣本暴露於冷白光約 75 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種經修飾之寡肽約 1.5 至約 10 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本暴露於冷白光約 100 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種前述寡肽約 1.5 至約 20 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本暴露於冷白光約 150 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種前述寡肽約 1.5 至約 20 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本暴露於冷白光約 300 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種寡肽約 1.5 至約 50 倍之增加- 參見以下實例 4。

【0307】 藉由使抗 VEGF 組合物之樣本暴露於紫外光約 4 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種如上所述之寡肽約 1.5 至約 3 倍之增加。在另一態樣中，藉由使樣本暴露於紫外光約 10 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種寡肽約 1.5 至約 10 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本暴露於紫外光約 16 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種寡肽約 1.5 至約 10 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本暴露於紫外光約 20 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種寡肽約 1.5 至約 25 倍之增加。在仍另一態樣中，藉由使樣本基質暴露於紫外光約 40 小時，抗 VEGF 組合物可包含一或多種寡肽約 1.5 至約 25 倍之增加。參見實例 4。

醣多樣性(glycodiversity) –使用 CDM 產生之抗 VEGF 蛋白

【0308】 本發明之組合物包含抗 VEGF 蛋白，其中在 CDM 中產生之抗 VEGF 蛋白具有多種醣多樣性。抗 VEGF 蛋白之不同醣化譜在本發明之範疇內。

【0309】 在本發明之一些例示性實施例中，組合物可包含在一或多個天冬醯胺處如下經醣化之抗 VEGF 蛋白：G0-GlcNAc 醣化；G1-GlcNAc 醣化；G1S-GlcNAc 醣化；G0 醣化；G1 醣化；G1S 醣化；G2 醣化；G2S 醣化；G2S2 醣化；G0F 醣化；G2F2S 醣化；G2F2S2 醣化；G1F 醣化；G1FS 醣化；G2F 醣化；G2FS 醣化；G2FS2 醣化；G3FS 醣化；G3FS3 醣化；G0-2GlcNAc 醣化；Man4 醣化；Man4_A1G1 醣化；Man4_A1G1S1 醣化；Man5 醣化；

Man5_A1G1 醣化；Man5_A1G1S1 醣化；Man6 醣化；Man6_G0+磷酸醣化；Man6+磷酸醣化；及/或 Man7 醣化。在一態樣中，感興趣之蛋白質可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。

【0310】 在一實施例中，組合物可具有如下醣化譜：約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 50%總唾液酸化聚醣、約 6%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(實例 6)。

【0311】 在一實施例中，組合物可包含抗 VEGF 蛋白，其中感興趣之蛋白質在約 32.4%天冬醯胺 123 殘基及/或約 27.1%天冬醯胺 196 殘基處具有 Man5 醣化。在一態樣中，感興趣之蛋白質可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。

【0312】 在另一實施例中，組合物可具有約 40%、約 41%、約 42%、約 43%、約 44%、約 45%、約 46%、約 47%、約 48%、約 49%或約 50%總岩藻醣化聚醣。

【0313】 在仍另一實施例中，組合物可具有約 30%、約 31%、約 32%、約 33%、約 34%、約 35%、約 36%、約 37%、約 38%、約 39%、約 40%、約 41%、約 42%、約 43%、約 44%、約 45%、約 46%、約 47%、約 48%、約 49%或約 50%總唾液酸化聚醣。

【0314】 在一實施例中，組合物可具有約 6 %、約 7%、約 8%、約 8%、約 10%、約 11%、約 12%、約 13%、約 14%或約 15%甘露糖-5。

【0315】 在另一實施例中，組合物可具有約 60%、約 61%、約 62%、約 63%、約 64%、約 65%、約 66%、約 67%、約 68%、約 69%、約 70%、約 71%、約 72%、約 73%、約 74%、約 75%、約 76%、約 77%、約 78%或約 79%總半乳醣化聚醣。

【0316】 在一實施例中，抗 VEGF 蛋白可具有水準降低了約 1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%之岩藻醣化聚醣。與使用大豆水解物產生的抗 VEGF 蛋白中之岩藻醣化聚醣水準相比，在一或多個前述值內之範圍：例如，1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、1-30%、1-35%、1-40%、1-41%、

1-42%、1-43%、1-44%、1-45%、1-46%、1-47%、1-48%、1-49%、1-50%、2-10%、2-15%、2-20%、2-25%、2-30%、2-35%、2-40%、2-41%、2-42%、2-43%、2-44%、2-45%、2-46%、2-47%、2-48%、2-49%、2-50%、3-10%、3-15%、3-20%、3-25%、3-30%、3-35%、3-40%、3-41%、3-42%、3-43%、3-44%、3-45%、3-46%、3-47%、3-48%、3-49%、3-50%、4-10%、4-15%、4-20%、4-25%、4-30%、4-35%、4-40%、4-41%、4-42%、4-43%、4-44%、4-45%、4-46%、4-47%、4-48%、4-49%、4-50%或 1-99%。

【0317】 在一實施例中，抗 VEGF 蛋白可具有水準降低了約 1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%之唾液酸化聚醣。與使用大豆水解物產生的抗 VEGF 蛋白中之唾液酸化聚醣水準相比，在一或多個前述值內之範圍：例如，1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、1-30%、1-35%、1-40%、1-41%、1-42%、1-43%、1-44%、1-45%、1-46%、1-47%、1-48%、1-49%、1-50%、2-10%、2-15%、2-20%、2-25%、2-30%、2-35%、2-40%、2-41%、2-42%、2-43%、2-44%、2-45%、2-46%、2-47%、2-48%、2-49%、2-50%、3-10%、3-15%、3-20%、3-25%、3-30%、3-35%、3-40%、3-41%、3-42%、3-43%、3-44%、3-45%、3-46%、3-47%、3-48%、3-49%、3-50%、4-10%、4-15%、4-20%、4-25%、4-30%、4-35%、4-40%、4-41%、4-42%、4-43%、4-44%、4-45%、4-46%、4-47%、4-48%、4-49%、4-50%或 1-99%。

【0318】 在另一實施例中，抗 VEGF 蛋白可具有水準降低了約 1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%之半乳醣化聚醣。與使用大豆水解物產生的抗 VEGF 蛋白中之半乳醣化聚醣水準相比，在一或多個前述值內之範圍：例如，1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、1-30%、1-35%、1-40%、1-41%、1-42%、1-43%、1-44%、1-45%、1-46%、1-47%、1-48%、1-49%、1-50%、2-10%、2-15%、2-20%、2-25%、2-30%、2-35%、2-40%、2-41%、2-42%、2-43%、2-44%、2-45%、2-46%、2-47%、2-48%、2-49%、2-50%、3-10%、

3-15%、3-20%、3-25%、3-30%、3-35%、3-40%、3-41%、3-42%、3-43%、3-44%、3-45%、3-46%、3-47%、3-48%、3-49%、3-50%、4-10%、4-15%、4-20%、4-25%、4-30%、4-35%、4-40%、4-41%、4-42%、4-43%、4-44%、4-45%、4-46%、4-47%、4-48%、4-49%、4-50%或 1-99%。

【0319】 在一實施例中，抗 VEGF 蛋白可具有水準提高了約 1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%之甘露醣化聚醣。與使用大豆水解物產生的抗 VEGF 蛋白中之甘露醣化聚醣水準相比，在一或多個前述值內之範圍：例如，1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、1-30%、1-35%、1-40%、1-41%、1-42%、1-43%、1-44%、1-45%、1-46%、1-47%、1-48%、1-49%、1-50%、2-10%、2-15%、2-20%、2-25%、2-30%、2-35%、2-40%、2-41%、2-42%、2-43%、2-44%、2-45%、2-46%、2-47%、2-48%、2-49%、2-50%、3-10%、3-15%、3-20%、3-25%、3-30%、3-35%、3-40%、3-41%、3-42%、3-43%、3-44%、3-45%、3-46%、3-47%、3-48%、3-49%、3-50%、4-10%、4-15%、4-20%、4-25%、4-30%、4-35%、4-40%、4-41%、4-42%、4-43%、4-44%、4-45%、4-46%、4-47%、4-48%、4-49%、4-50%或 1-99%。

【0320】 此部分中所述之組合物可分別由以下部分 IV 及 V 中所述之若干個上游及下游參數產生。

IV. 使用上游製程技術製備組合物

【0321】 對於生物製劑而言，需要施行強健而靈活之上游製程。有效的上游製程可實現感興趣之蛋白質的所需產生及按比例放大。發明者發現包含抗 VEGF 蛋白的本發明之組合物可藉由調節上游蛋白產生期間的條件，諸如 CDM 之培養基組分的變化來產生。上游製程中之每個步驟皆會影響所製造的蛋白質之品質、純度及數量。

【0322】 本揭露提供使用 CDM 產生的阿柏西普及/或 MiniTrap 之某些變異體之存在的證據。此等變異體包括包含一或多個經氧化之胺基酸殘基的同功型。經氧化殘基之實例包括但不限於一或多個組胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸殘基。藉由使用經修飾之 CDM 產生的組合物可產生抗

VEGF 蛋白之製劑，該製劑具有阿柏西普及/或 MiniTrap 之蛋白質變異體的所需目標值。如上所述，亦可存在與使用 CDM 產生之級分相關的黃棕色。(如上所提及，並非發明者測試的所有 CDM 皆表現出明顯變色。)

【0323】 本發明包括在細胞表現感興趣之重組蛋白的合適條件下在經修飾之 CDM 中培養宿主細胞，接著收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑。此一經修飾之 CDM 可用於產生如上文部分 III 中所述之組合物。(注意，CDM 為表現阿柏西普時存在黃棕色之培養基。)

【0324】 在一實施例中，該方法包含在合適的條件下在 CDM 中培養宿主細胞，其中宿主細胞表現感興趣之重組蛋白，諸如阿柏西普。該方法進一步包含收穫由細胞產生的感興趣之重組蛋白之製劑，其中合適的條件包括具有以下之 CDM：在該 CDM 中小於約 55 μM 之鐵累積濃度、在該 CDM 中小於或等於約 0.8 μM 之銅累積濃度、在該 CDM 中小於或等於約 0.40 μM 之鎳累積濃度、在該 CDM 中小於或等於約 56 μM 之鋅累積濃度、在該 CDM 中小於約 10 mM 之半胱胺酸累積濃度；及/或在該 CDM 中對於單一抗氧化劑而言濃度為約 0.001 mM 至約 10 mM 之抗氧化劑，及若在該 CDM 中添加多種抗氧化劑，則不大於約 30 mM 之累積濃度。

【0325】 在本實施例之一態樣中，使用合適的條件獲得之製劑造成阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體減少至所需量的阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體(稱為阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體的「目標值」)。在此實施例之又一態樣中，當將包括阿柏西普及 VEGF MiniTrap 之變異體的蛋白質製劑歸一化為 5 g/L、10 g/L 或甚至更高之濃度時，使用合適的條件獲得之製劑導致製劑之顏色減至所需 BY 值(稱為「目標 BY 值」)。

【0326】 在本實施例之又一態樣中，變異體之目標 BY 值及/或目標值可在力價增加或不顯著減小之製劑中獲得(參見實例 5)。

【0327】 在一些實施例中，藉由使用經修飾之 CDM 產生的組合物可產生具有所需目標 BY 值的抗 VEGF 蛋白之製劑，其中該製劑之顏色表徵如下：

(i) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY2；

(ii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY3；

(iii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY4；

(iv) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY5；

(v) 介於歐洲顏色標準 BY2 與 BY3 之間；

(vi) 介於歐洲顏色標準 BY3 與 BY4 之間；

(vii) 介於歐洲顏色標準 BY4 與 BY5 之間，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白，且其中組合物之樣本可自經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。如在以下實例 9，**表 9-3** 中所見，包含 5 g/L 阿柏西普之蛋白 A 析出液呈黃棕色，經量測為具有 1.77 之 b*值。此一樣本在 AEX 下游產生時具有 0.50 之 b*值，證明瞭 AEX 降低樣本之黃棕色著色的效用(**表 9-3**)。

【0328】 藉由使用經修飾之 CDM 產生的組合物可產生抗 VEGF 蛋白之製劑，其中製劑之顏色藉由 CIELAB 標度中公認的標準顏色表徵來表徵：

(i) 黃棕色不超過約 22-23 之 b*值；

(ii) 黃棕色不超過約 16-17 之 b*值；

(iii) 黃棕色不超過 9-10 之 b*值；

(iv) 黃棕色不超過 4-5 之 b*值；

(v) 黃棕色不超過 2-3 之 b*值；

(vi) 介於 17-23 之間的 b*值；

(vii) 介於 10-17 之間的 b*值；

(viii) 介於 5-10 之間的 b*值；

(ix) 介於 3-5 之間的 b*值；或

(x) 介於 1-3 之間的 b*值，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白，且其中組合物自經澄清之收穫物的蛋白 A 析出液中作為樣本獲得。參見實例 9，**表 9-3**。

【0329】 對於添加至細胞培養物中以形成經修飾之 CDM 的組分，術語「累積量」係指在細胞培養過程中添加至生物反應器中以形成 CDM 的特定組分之總量，包括在培養開始時添加的組分之量(在第 0 天的 CDM)及隨後添加的組分之量。當計算組分之累積量時，亦包括在生物反應器產生之前(亦即，在第 0 天的 CDM 之前)添加至種菌培養物或接種物中的組分之量。累積量不

受培養過程中組分隨時間損失(例如，經由代謝或化學降解)之影響。因此，具有相同累積量之組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若在不同時間將組分添加至兩種培養物中(例如，若在一種培養物中，所有組分均在開始時添加，而在另一種培養物中，組分係隨時間之推移而添加)。累積量亦不受培養過程中組分隨時間之原位合成(例如，經由代謝或化學轉化)的影響。因此，具有相同累積量之給定組分的兩種培養物可能仍具有不同絕對水準，例如，若組分係經由生物轉化過程在兩種培養物之一種中原位合成。累積量可以例如組分之克數或莫耳數之單位表示。術語「累積濃度」係指組分之累積量除以生產批次開始時生物反應器中液體之體積，包括培養中使用的任何接種物對起始體積之貢獻。例如，若生物反應器在生產批次開始時包含 2 升細胞培養基，並且在第 0、1、2 及 3 天添加 1 克之組分 X，則第 3 天之後的累積濃度為 2 g/L (亦即 4 克除以 2 升)。若在第 4 天將另外 1 升不含組分 X 之液體添加至生物反應器中，則累積濃度將保持為 2 g/L。若在第 5 天自生物反應器中損失一些液體(例如經由蒸發)，則累積濃度將保持為 2 g/L。累積濃度可以例如克/升或莫耳/升之單位表示。

A. 胺基酸：

【0330】 在一些實施例中，可藉由降低或提高 CDM 中胺基酸之累積濃度來獲得經修飾之 CDM。此等胺基酸之非限制性實例包括丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸(或其鹽)。與起始 CDM 相比，經修飾之 CDM 中的此等胺基酸之累積量之增加或減少可為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%，以及在上述一或多者內之範圍。替代地，與未經修飾之 CDM 相比，經修飾之 CDM 中的一或多種胺基酸之累積量之增加或減少可為約 5%至約 20%、約 10%至約 30%、約 30%至約 40%、約 30%至約 50%、約 40%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%，以及在上述一或多者內之範圍(參見**圖 25-27** 及實例 5)。

【0331】 在一些實施例中，可藉由降低 CDM 中半胱胺酸之累積濃度來獲得經修飾之 CDM。與未經修飾之 CDM 相比，CDM 中形成經修飾之 CDM 的半胱胺酸之量之減少可為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%，以及在上述一或多者內之範圍。替代地，與 CDM 相比，經修飾之 CDM 中的半胱胺酸之累積量之減少可為約 5%至約 20%、約 10%至約 30%、約 30%至約 40%、約 30%至約 50%、約 40%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%，以及在上述一或多者內之範圍。在一態樣中，經修飾之 CDM 中的累積半胱胺酸之量小於約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM 或約 10 mM (參見**圖 25-27** 及實例 5)。

【0332】 在一些實施例中，可藉由用胱胺酸替換 CDM 中的至少一定百分比之累積半胱胺酸來獲得經修飾之 CDM。與未經修飾之 CDM 相比，替換可為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%，以及在上述一或多者內之範圍。替代地，與未經修飾之 CDM 相比，替換可為約 5%至約 20%、約 10%至約 30%、約 30%至約 40%、約 30%至約 50%、約 40%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%，以及在上述一或多者內之範圍(參見**圖 25-27** 及實例 5)。

【0333】 在一些實施例中，可藉由用硫酸半胱胺酸替換 CDM 中的至少一定百分比之累積半胱胺酸來獲得經修飾之 CDM。與未經修飾之 CDM 相比，替換可為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%，以及在上述一或多者內之範圍。替代地，與未經修飾之 CDM 相比，替換可為約 5%至約 20%、約 10%至約 30%、約 30%至約 40%、約 30%至約 50%、約 40%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%，以及在上述一或多者內之範圍。

B. 金屬：

【0334】　在一些實施例中，可藉由降低或提高 CDM 中的金屬之累積濃度來獲得經修飾之 CDM。金屬之非限制性實例包括鐵、銅、錳、鉬、鋅、鎳、鈣、鉀及鈉。與未經修飾之 CDM 相比，經修飾之 CDM 中的一或多種金屬之量之增加或減少可為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%，以及在上述一或多者內之範圍。替代地，與未經修飾之 CDM 相比，經修飾之 CDM 中的一或多種金屬之累積量之增加或減少可為約 5%至約 20%、約 10%至約 30%、約 30%至約 40%、約 30%至約 50%、約 40%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%，以及在上述一或多者內之範圍(參見**圖 25-27** 及實例 5)。

C. 抗氧化劑：

【0335】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含一或多種抗氧化劑。抗氧化劑之非限制性實例可包括牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸、硫辛酸、麩胱甘肽、氯化膽鹼、氫皮質酮、維生素 C、維生素 E 及其組合(參見**圖 28A-E** 及實例 5)。

【0336】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 mM 至約 20 mM 牛磺酸，亦即 0.01 mM 至約 1 mM、約 0.01 mM 至約 5 mM、約 0.01 mM 至約 10 mM、0.1 mM 至約 1 mM、約 0.1 mM 至約 5 mM、約 0.1 mM 至約 10 mM、約 1 mM 至約 5 mM、約 1 mM 至約 10 mM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0337】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 mM 至約 20 mM 次牛磺酸，亦即 0.01 mM 至約 1 mM、約 0.01 mM 至約 5 mM、約 0.01 mM 至約 10 mM、0.1 mM 至約 1 mM、約 0.1 mM 至約 5 mM、約 0.1 mM 至約 10 mM、約 1 mM 至約 5 mM、約 1 mM 至約 10 mM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0338】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 mM 至約 20 mM 甘胺酸，亦即 0.01 mM 至約 1 mM、約 0.01 mM 至約 5 mM、約 0.01 mM 至約 10 mM、0.1 mM 至約 1 mM、約 0.1 mM 至約 5 mM、約 0.1 mM 至約 10 mM、約 1 mM 至約 5 mM、約 1 mM 至約 10 mM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0339】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 μM 至約 5 μM 硫辛酸，亦即，約 0.01 μM 至約 0.1 μM、約 0.1 μM 至約 1 μM、約 1 μM 至約 2.5

μM、約 1 μM 至約 3 μM、約 1 μM 至約 5 μM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0340】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 M 至約 5 mM 麩胱甘肽，亦即 0.01 mM 至約 1 mM、0.1 mM 至約 1 mM、約 0.1 mM 至約 5 mM、約 1 mM 至約 5 mM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0341】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 0.01 μM 至約 5 μM 氫皮質酮，亦即，約 0.01 μM 至約 0.1 μM、約 0.1 μM 至約 1 μM、約 1 μM 至約 2.5 μM、約 1 μM 至約 3 μM、約 1 μM 至約 5 μM，以及在上述一或多者內之範圍。

【0342】　在一些實施例中，經修飾之 CDM 包含約 1 μM 至約 50 μM 維生素 C，亦即，約 1 μM 至約 5 μM、約 5 μM 至約 20 μM、約 10 μM 至約 30 μM、約 5 μM 至約 30 μM、約 20 μM 至約 50 μM、約 25 μM 至約 50 μM，以及在上述一或多者內之範圍。

D. 為調節醣化而對培養基之改變：

【0343】　本揭露亦包括藉由改變 CDM 中的某些組分之累積濃度來調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法。可基於添加至 CDM 中的組分之累積量來改變總岩藻醣化%、總半乳醣化%、總唾液酸化%及甘露糖-5。

【0344】　在例示性實施例中，調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法可包含向 CDM 中補充尿苷。抗 VEGF 蛋白可具有約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 2%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(參見以下實例 6)。

【0345】　在一些實施例中，調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法可包含向 CDM 中補充錳。在一態樣中，CDM 在補充前不含錳。抗 VEGF 蛋白可具有約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 2%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(參見以下實例 6)。

【0346】　在一些實施例中，調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法可包含向 CDM 中補充半乳糖。在一態樣中，CDM 在補充前不含半乳糖。抗 VEGF 蛋白可具有約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 2%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(實例 6)。

【0347】　在一些實施例中，調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法可包含向 CDM 中補充地塞米松。在一態樣中，CDM 在補充前不含地塞米松。抗 VEGF 蛋白可具有約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 2%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(參見以下實例 6)。

【0348】　在一些實施例中，調節抗 VEGF 蛋白之醣化的方法可包含向 CDM 中補充尿苷、錳、半乳糖及地塞米松中之一或多種。在一態樣中，CDM 在補充之前不含尿苷、錳、半乳糖及地塞米松中之一或多種。抗 VEGF 蛋白可具有約 40%至約 50%總岩藻醣化聚醣、約 30%至約 55%總唾液酸化聚醣、約 2%至約 15%甘露糖-5、及約 60%至約 79%半乳醣化聚醣。(實例 6)。

V. 使用下游製程技術製備組合物

【0349】　包含本發明之抗 VEGF 蛋白的組合物可藉由調節下游蛋白質產生過程中之條件來產生。發明者發現最佳化下游程序可導致抗 VEGF 蛋白之某些變異體最少化以及變色。下游製程之最佳化可產生具有減少的側氧基變異體以及最佳化之顏色特徵的組合物。

【0350】　下游製程技術可單獨使用或與前述部分 IV 中所述之上游製程技術組合使用。

A. 陰離子交換層析：

【0351】　在一些實施例中，本發明之組合物可涉及一種製程，其包含：在 CDM 中在宿主細胞中表現抗 VEGF 蛋白，其中抗 VEGF 蛋白自宿主細胞分泌至培養基中，及獲得經澄清之收穫物。收穫物經歷以下步驟：(a)將由收穫物獲得之生物樣本加載至陰離子交換層析(AEX)管柱上；(b)用合適的洗滌緩衝液洗滌 AEX 管柱，(c)收集流通級分，視情況(d)用合適的汽提緩衝液洗滌管柱，及(e)收集汽提級分。

【0352】　流通(flowthrough)級分可包含抗 VEGF 蛋白之側氧基變異體，當與陰離子交換層析管柱之汽提級分中的側氧基變異體相比時，其為抗 VEGF 蛋白樣本之約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%。例如，參看**表 9-5** 及**表 9-6**，流通級分包含抗 VEGF 蛋白之經氧化變異體，其中與汽

提級分中之經氧化變異體相比，若干組胺酸及色胺酸殘基為約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% (以及在上述一或多者內之範圍)經氧化。

【0353】 用於 AEX 管柱的平衡緩衝液及洗滌緩衝液之 pH 值均可為約 8.20 至約 8.60。在另一態樣中，用於 AEX 管柱之平衡緩衝液及洗滌緩衝液之電導率均可為約 1.50 至約 3.0 mS/cm。在一態樣中，平衡緩衝液及洗滌緩衝液可為約 50 mM Tris 鹽酸鹽。在一態樣中，汽提緩衝液包含 2M 氯化鈉或 1N 氫氧化鈉或兩者(參見**表 2-2**)。實例 2 進一步說明最佳化平衡緩衝液及洗滌緩衝液之濃度及電導率。

【0354】 蛋白質變異體可包括如下一或多個殘基之修飾：一或多個天冬醯胺經脫醯胺；一或多個天冬胺酸轉化為異天冬胺酸及/或 Asn；一或多個甲硫胺酸經氧化；一或多個色胺酸轉化為 N-甲醯基犬尿胺酸；一或多個色胺酸為單羥基色胺酸；一或多個色胺酸為二羥基色胺酸；一或多個色胺酸為三羥基色胺酸；一或多個精胺酸轉化為 Arg 3-去氧葡醛酮糖；C 端甘胺酸不存在；及/或存在一或多個非醣化糖位點。

【0355】 感興趣之蛋白質可為阿柏西普、抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap。可藉由以下方式中之一或多種形成蛋白質變異體：(i)自選自 His86、His110、His145、His209、His95、His19 及/或 His203 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)之組胺酸殘基的組胺酸之氧化；(ii)選自 Trp58 及/或 Trp138 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)處之色胺酸殘基的色胺酸殘基之氧化；(iii) Tyr64 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效位置)處的酪胺酸殘基之氧化；(iv)選自 Phe44 及/或 Phe166 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)的苯丙胺酸殘基之氧化；及/或(v)選自 Met10、Met 20、Met163 及/或 Met192 (或具有阿柏西普之某些結構特徵的蛋白質上之等效殘基位置)的甲硫胺酸殘基之氧化。

【0356】 流通級分可包含以下一或多者：

(a)一定百分比之已氧化成 2-側氧基-組胺酸的組胺酸殘基，其中其顏色表徵如下：

(i) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY2；

(ii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY3；

(iii) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY4；

(iv) 黃棕色不超過歐洲顏色標準 BY5；

(v) 介於歐洲顏色標準 BY2 與 BY3 之間；

(vi) 介於歐洲顏色標準 BY3 與 BY4 之間；

(vii) 介於歐洲顏色標準 BY4 與 BY5 之間，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白，且其中組合物自流通級分中作為樣本獲得。

(b)一定百分比之已氧化成 2-側氧基-組胺酸的組胺酸殘基。此外，其顏色之特徵在於具有近似於 BY2、BY3、BY4、BY5、BY6、BY7 之黃棕色；或不比 BY2 暗/強烈、不比 BY3 暗、不比 BY4 暗、不比 BY5 暗、不比 BY6 暗、不比 BY7 暗；或介於 BY2 與 BY3 之間、介於 BY2 與 BY4 之間、介於 BY3 與 BY4 之間或介於 BY3 與 BY5 之間。

(c)一定百分比之已氧化成 2-側氧基-組胺酸的組胺酸殘基，其中其顏色以如下 CIE L*, a*, b*顏色空間中之顏色表徵：

(i) 黃棕色不超過約 22-23 之 b*值；

(ii) 黃棕色不超過約 16-17 之 b*值；

(iii) 黃棕色不超過 9-10 之 b*值；

(iv) 黃棕色不超過 4-5 之 b*值；

(v) 黃棕色不超過 2-3 之 b*值；

(vi) 介於 17-23 之間的 b*值；

(vii) 介於 10-17 之間的 b*值；

(viii) 介於 5-10 之間的 b*值；

(ix) 介於 3-5 之間的 b*值；或

(x) 介於 1-3 之間的 b*值，其中組合物包含約 5 g/L 或約 10 g/L 之抗 VEGF 蛋白，且其中組合物自流通級分中作為樣本獲得。

(d)組合物中不多於約 1%、不多於約 0.1%或約 0.1-1%、0.2-1%、0.3-1%、0.4-1%、0.5-1%、0.6-1%、0.7-1%、0.8-1%或 0.9-1%之組胺酸殘基經氧化成 2-側氧基-組胺酸。百分比計算描述於部分 II 中。

B. 親和力層析：

【0357】 在一些實施例中，本發明之組合物可使用包含以下之方法產生：在宿主細胞中表現抗 VEGF 蛋白，其中抗 VEGF 蛋白由宿主細胞分泌至培養基中並獲得經澄清之收穫物。收穫物經歷以下步驟，包含：(a)將自經澄清之收穫物獲得的生物樣本加載至親和力層析管柱上，其中親和力層析包含能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白之蛋白質；(b)用合適的溶析緩衝液洗滌親和力層析管柱，及(c)收集溶析之級分。例如，如**表 7-1** 及**表 7-7** 至 **7-10** 所例示，使用 $VEGF_{165}$ 作為能夠選擇性或特異性地結合至抗 VEGF 蛋白之蛋白質並按照上述方法收集溶析之級分，成功產生 MT5 (抗 VEGF 蛋白)、阿柏西普及抗 VEGF scFv 片段。**表 7-1** 亦揭示使用以下各物作為能夠選擇性或特異性地結合至 MT5 之不同蛋白質成功地產生 MT5：(i) mAb1 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 73 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 74 為輕鏈)；(ii) mAb2 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 75 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 76 為輕鏈)；(iii) mAb3 (小鼠抗 VEGF-R1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 77 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 78 為輕鏈)；以及(iv) mAb4 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 79 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 80 為輕鏈)。

【0358】 關於上述步驟(a)，有待加載至親和力管柱上的生物樣本可來自其中經澄清之收穫物可在親和之前經歷生產的樣本，包括但不限於離子交換層析(陰離子或陽離子)。在使用親和步驟之前，亦可採用熟習此項技術者熟知之其他層析程序。重要之處在於包含抗 VEGF 蛋白之生物樣本可經歷親和力層析。

【0359】 在一些實施例中，本發明之組合物可使用包含以下之方法產生：在宿主細胞中表現 VEGF MiniTrap 蛋白，其中 VEGF MiniTrap 由宿主細胞分泌至培養基中，且其中可進一步處理培養基以形成經澄清之收穫物。可藉由已知的層析程序進一步處理此收穫物，從而產生包含 VEGF MiniTrap 之生物樣本。此生物樣本可藉由採用以下步驟進一步處理，包含：(a)將生物樣本加載至親和力層析管柱上，其中親和力層析包含能夠與 VEGF MiniTrap 蛋白選擇性或特異性地結合或相互作用之蛋白；(b)用合適的溶析緩衝液洗滌親和

力層析管柱，及(c)收集溶析之級分。再次參看**表 7-1**，此表中揭示使用以下各物作為能夠選擇性或特異性地結合至 MT5 或與 MT5 相互作用之不同蛋白質成功地產生 MT5 (VEGF MiniTrap) ：(i) $VEGF_{165}$；(ii) mAb1 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 73 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 74 為輕鏈)；(iii) mAb2 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 75 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 76 為輕鏈)；(iv) mAb3 (小鼠抗 VEGF-R1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 77 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 78 為輕鏈)；以及(v) mAb4 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 79 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 80 為輕鏈)。

【0360】 在一實施例中，親和力層析亦可用於分離其他 MiniTrap 蛋白。切割阿柏西普之後，可使用對經切割之阿柏西普有特異性之結合物(binder)對包含經切割之阿柏西普的樣本進行親和力層析。在一態樣中，結合物可為抗體或其部分。

【0361】 可使用例如用 IdeS 蛋白酶(FabRICATOR)或其變異體對阿柏西普進行蛋白水解消化來促進阿柏西普之切割，以產生 VEGF MiniTrap。用 IdeS 蛋白酶或其變異體切割阿柏西普可產生包含 Fc 片段及 VEGF MiniTrap 的產物之混合物。VEGF MiniTrap 可藉由使用本文所述之一或多種生產策略進一步處理。

【0362】 在一些例示性實施例中，能夠與抗 VEGF 蛋白諸如阿柏西普或 MiniTrap 選擇性或特異性結合(「結合物」)或與之相互作用的蛋白質可來源於人類或小鼠。

【0363】 親和力產生過程可進一步包含在加載生物樣本之前使用平衡緩衝液平衡親和力管柱。例示性平衡緩衝液可為 20 mM 磷酸鈉 pH 6-8 (尤其是 7.2)、10 mM 磷酸鈉、500 mM NaCl pH 6-8 (尤其是 7.2)、50 mM Tris pH 7-8、DPBS pH 7.4。

【0364】 可使用合適的緩衝液諸如 DPBS 來加載生物樣本。

【0365】 此親和力產生過程可進一步包含用一或多種洗滌緩衝液洗滌親和力管柱。可洗滌管柱一次或多次。此外，洗滌液亦可作為洗滌級分收集。洗滌緩衝液之 pH 值可皆為約 7.0 至約 8.60。在一態樣中，洗滌緩衝液可為

DPBS。在另一態樣中，洗滌緩衝液可為 20 mM 磷酸鈉 pH 6-8 (尤其是 7.2)、10 mM 磷酸鈉、500 mM NaCl pH 6-8 (尤其是 7.2)、50 mM Tris pH 7-8 或 DPBS pH 7.4。

【0366】 此親和力過程可進一步包含用一或多種合適的溶析緩衝液洗滌親和力管柱及收集溶析之級分。可洗滌管柱一次或多次。此一合適的溶析緩衝液之非限制性實例包括：乙酸銨(pH 值為約 2.0 至約 3.0)、乙酸(pH 值為約 2.0 至約 3.2)、甘胺酸-HCl (pH 值為約 2.0 至約 3.0)、檸檬酸鈉(pH 值為約 2.0 至約 3.0)、檸檬酸(pH 值為約 2.0 至約 3.0)、異硫氰酸鉀(pH 值為約 2.0 至約 3.0)或其組合。

【0367】 在一些態樣中，可使用中和緩衝液中和溶析級分。此一中和緩衝液之一例子為 Tris 至 Tris-HCl (pH 值為約 7.0 至約 9.0)。

C. IdeS 突變體：

【0368】 用於切割 Fc 融合蛋白(諸如阿柏西普)之 IdeS 蛋白酶在鹼性 pH 條件下會迅速喪失酶活性，這可限制其在 VEGF MiniTrap 製造期間之使用。因此，已開發在鹼性 pH 下，例如在強鹼諸如 NaOH 存在下更穩定之變異體。此等鹼性條件可為 0.05N NaOH 1 小時或 0.1N NaOH 0.5 小時。

【0369】 在一些實施例中，IdeS 突變體可具有在其全長上與由以下組成之群組中列出之胺基酸序列具有至少約 70%序列一致性的胺基酸序列：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一些態樣中，胺基酸序列在其全長上與上文剛剛提及之胺基酸序列具有約 75%、80%、85%、90%、95%或約 100%序列一致性。

【0370】 在一些實施例中，IdeS 突變體可具有編碼多肽的經分離之核酸分子，該多肽之胺基酸序列在其全長上與由以下組成之群組中列出之胺基酸序列具有至少 70%序列一致性：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16。在一些態樣中，胺基

酸序列在其全長上與上文剛剛提及之胺基酸序列具有約 75%、80%、85%、90%、95%或約 100%序列一致性。

【0371】 在一些實施例中，該多肽具有在其全長上與由以下組成之群組中列出之胺基酸序列具有至少 70%序列一致性的胺基酸序列：SEQ ID NO.: 2、SEQ ID NO.: 3、SEQ ID NO.: 4、SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9、SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15 及 SEQ ID NO.: 16，並由具有合適載體之宿主細胞表現，該載體包含編碼所識別之肽的核酸。在一態樣中，核酸分子與表現控制序列可操作地連接，該表現控制序列能夠指導其在宿主細胞中之表現。在一態樣中，載體可為質體。在一些態樣中，胺基酸序列在其全長上與上文剛剛提及之胺基酸序列具有約 75%、80%、85%、90%、95%或約 100%序列一致性。在一些態樣中，經分離之核酸分子可用於編碼多肽。

【0372】 在一些實施例中，IdeS 突變體可具有包含由 SEQ ID NO.: 1 (IdeS) 定義之親本胺基酸序列的胺基酸序列，其中在位置 87、130、182 及/或 274 處之天冬醯胺殘基突變為除天冬醯胺以外之胺基酸。在一態樣中，與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高。在另一態樣中，與親本胺基酸序列相比，該突變可使在鹼性 pH 值下之化學穩定性提高 50%。在一態樣中，胺基酸可選自天冬胺酸、白胺酸及精胺酸。在一具體態樣中，位置 87 處之天冬醯胺殘基突變為天冬胺酸殘基。在另一具體態樣中，位置 130 處之天冬醯胺殘基突變為精胺酸殘基。在仍另一具體態樣中，位置 182 處之天冬醯胺殘基突變為白胺酸殘基。在仍另一具體態樣中，位置 274 處之天冬醯胺殘基突變為天冬胺酸殘基。在仍另一具體態樣中，位置 87 及 130 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 87 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 87 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 130 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 130 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 87、130 及 182 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，

位置 87、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 130、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在仍另一具體態樣中，位置 87、130、182 及 274 處之天冬醯胺殘基經突變。在一些態樣中，胺基酸序列在其全長上與上述胺基酸序列具有約 75%、80%、85%、90%、95%或約 100%序列一致性。在一些態樣中，經分離之核酸分子可用於編碼多肽。

【0373】 熟悉標準分子生物學技術的熟習此項技術之普通技術人員可在不過度負擔之情況下製備及使用本發明之 IdeS 突變體。標準技術可用於重組 DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉化(例如，電穿孔、脂質轉染)。參見，例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 如前述，其出於任何目的以引用之方式併入本文。可根據製造商說明書或如本文所述來執行酶反應及產生技術。

VI. 一般蛋白質產生

【0374】 設想多種不同產生技術，包括但不限於親和力層析、離子交換層析、混合模式層析、尺寸排阻層析及疏水性相互作用層析(單獨或以組合形式)在本發明之範疇內。此等層析步驟視具體的分離形式而定，基於電荷、疏水性程度或尺寸或其組合來分離生物樣本之蛋白質混合物。對於前述提及之每項技術，皆可使用若干種不同的層析樹脂，從而允許根據所涉及之特定蛋白質精確調整生產流程。每種分離方法皆會造成蛋白質以不同速率穿過管柱，從而實現物理分離，隨著蛋白質進一步穿過管柱或選擇性地黏附於分離介質上，物理分離會增加。接著，將蛋白質(i)使用適當的溶析緩衝液進行差異溶析及/或(ii)由所用管柱獲得之流通級分中收集，視情況，用適當的平衡緩衝液洗滌管柱。在一些情況下，當雜質優先黏附於管柱上且感興趣之蛋白質較少黏附時，感興趣之蛋白質便會與雜質(HCP、蛋白質變異體 等)分離，亦即，感興趣之蛋白質不會吸附於特定管柱之固相上，且因此流過管柱。在一些情況下，當雜質無法吸附於管柱上並因此流過管柱時，它們便會與感興趣之蛋白質分離。

【0375】 在使用上述上游產生方法及/或藉由此項技術中習知的替代產生方法產生重組蛋白後，產生過程可自分離步驟開始。一旦獲得包含感興趣之蛋白質(例如融合蛋白)的經澄清之溶液或混合物，便將感興趣之蛋白質與過

程相關之雜質(諸如由細胞(如 HCP)產生之其他蛋白質，以及產物相關之物質，諸如酸性或鹼性變異體)分離。可採用一或多種不同產生技術之組合，包括親和力層析、離子交換(例如 CEX、AEX)層析、混合模式(MM)層析及/或疏水性相互作用層析。此等產生步驟基於例如電荷、疏水性程度及/或表觀尺寸分離生物樣本內之組分混合物。對於本文提及之每項層析技術，許多層析樹脂係市售的，從而允許根據所涉及之特定蛋白質精確調整生產流程。每種分離方法皆允許蛋白質以不同速率穿過管柱，從而實現物理分離，隨著蛋白質進一步穿過管柱或選擇性地黏附於分離樹脂(或介質)上，物理分離會增加。接著可差異地收集蛋白質。在一些情況下，當其他組分特異性地吸附於管柱樹脂上，而感興趣之蛋白質不吸附時，感興趣之蛋白質便與生物樣本之組分分離。

A. 初步回收及病毒失活化

【0376】 在某些實施例中，本文揭示之產生方法之初始步驟涉及自生物樣本中澄清及初步回收感興趣之蛋白質。初步回收將包括一或多個離心步驟，以便自宿主細胞及伴隨的細胞片段中分離出感興趣之蛋白質。樣本之離心可例如但不限於在 7,000×g 至約 12,750×g 下進行。在大規模生產之情境下，可以一定流率在線進行該離心，該流率經設定成例如在所得上清液中達成 150 NTU 之濁度水準。接著可收集該上清液以進行進一步處理，或經由一或多個深度過濾器進行在線過濾，以進一步澄清樣本。

【0377】 在某些實施例中，初步回收可包括使用一或多個深度過濾步驟來澄清樣本，從而有助於處理感興趣之蛋白質。在其他實施例中，初步回收可包括在離心後使用一或多個深度過濾步驟。可在本發明之上下文中使用的深度過濾器之非限制性實例包括 Millistak+ X0HC、F0HC、D0HC、A1HC、B1HC 深度過濾器(EMD Millipore)；3M™型號 30/60ZA、60/90 ZA、VR05、VR07、delipid 深度過濾器(3M Corp.)。0.2 μm 過濾器，諸如賽多利斯(Sartorius)之 0.45/0.2 μm Sartopore™雙層或 Millipore 之 Express SHR 或 SHC 濾筒通常在深度過濾器之後。亦可使用熟習此項技術者熟知之其他過濾器。

【0378】 在某些實施例中，初步回收過程亦可為減少或失活化可存在於生物樣本中之病毒的關鍵。多種病毒減少/失活化方法中之任何一或多者可在

產生初步回收階段使用，包括：熱失活化(巴氏滅菌)、pH 失活化、緩衝劑/清潔劑處理、UV 及 γ 射線輻照以及添加某些化學失活化劑諸如 β-丙內酯，或例如啡啉銅，如美國專利第 4,534,972 號中所述，其全部教導皆以引用之方式併入本文。在本發明之某些例示性實施例中，樣本在初步回收階段期間暴露於清潔劑病毒失活化。在其他實施例中，樣本可在初步回收階段期間暴露於低 pH 失活化。

【0379】 在採用病毒減少/失活化之彼等實施例中，可對生物樣本進行調整(若需要)以用於其他產生步驟。例如，在低 pH 病毒失活化之後，在繼續產生過程之前，通常將樣本之 pH 值調節至更中性之 pH 值，例如，約 4.5 至約 8.5。另外，可用注射用水(WFI)稀釋混合物以獲得所需電導率。

B. 親和力層析

【0380】 在某些例示性實施例中，使生物樣本經歷親和力層析對於產生感興趣之蛋白質可為有利的。層析材料能夠選擇性地或特異性地與感興趣之蛋白質結合或相互作用。該層析材料之非限制性實例包括：蛋白 A 及蛋白 G。包含例如蛋白質或其部分之層析材料亦能夠與感興趣之蛋白質結合或相互作用。在一態樣中，感興趣之蛋白質為抗 VEGF 蛋白，諸如阿柏西普、MiniTrap 或與其相關之蛋白質。

【0381】 親和力層析可涉及使生物樣本經歷包含合適的蛋白 A 樹脂之管柱。當在本文中使用時，術語「蛋白 A」涵蓋自其天然來源回收之蛋白 A，合成產生之蛋白 A (例如，藉由肽合成或藉由重組技術)及其保留結合具有 C_H2/C_H3 區之蛋白質之能力的變異體。在某些態樣中，蛋白 A 樹脂藉由與分子之 Fc 部分(若其具有該區域)特異性相互作用而可用於多種抗體同種型的基於親和力之產生及分離。

【0382】 蛋白 A 樹脂有若干商業來源。一種合適的樹脂為來自 GE Healthcare 之 MabSelect™。合適的樹脂包括但不限於：來自 GE Healthcare 之之 MabSelect SuRe™、MabSelect SuRe LX、MabSelect、MabSelect SuRe pcc、MabSelect Xtra、rProtein A Sepharose；來自 EMD Millipore 之 ProSep HC、ProSep Ultra 及 ProSep Ultra Plus；來自 Life Technologies 之 MapCapture。裝填有 MabSelect™之合適的管柱之非限制性實例為直徑約 1.0 cm x 長度約

21.6 cm 之管柱(17 mL 床體積)。合適的管柱可包含樹脂，諸如 MabSelect™SuRe 或類似樹脂。蛋白 A 亦可由 Repligen、Pharmacia 及 Fermatech 商購獲得。

【0383】 樣本加載之前，可使用合適的緩衝液平衡親和力管柱。加載管柱後，可使用合適的洗滌緩衝液將管柱洗滌一次或多次。接著可使用適當的溶析緩衝液(例如，甘胺酸-HCl、乙酸或檸檬酸)溶析管柱。可使用熟習此項技術者熟知之技術諸如 UV 偵測器來監測析出液。可收集析出之感興趣之級分，接著準備以便進一步處理。

【0384】 在一態樣中，可例如藉由清潔劑或低 pH 對析出液進行病毒失活化。可選擇合適的清潔劑濃度或 pH 值(及時間)以獲得所需病毒失活化結果。病毒失活化後，通常對析出液進行 pH 值及/或電導率調整以便後續產生步驟。

【0385】 析出液可經由深度過濾器進行過濾以便在額外的層析精製(chromatographic polishing)步驟之前自感興趣之蛋白質中移除濁度及/或各種雜質。合適的深度過濾器之實例包括但不限於 Millistak+ XOHC、FOHC、DOHC、AIHC、X0SP 及 BIHC Pod 過濾器(EMD Millipore)或 Zeta Plus 30ZA/60ZA、60ZA/90ZA、delipid、VR07 及 VR05 過濾器(3M)。Emphaze AEX Hybrid Purifier 多機理過濾器亦可用於澄清析出液。為了由深度過濾步驟實現所需雜質移除及產物回收，可需將析出液池調節至特定的 pH 值及電導率。

C. 陰離子交換層析

【0386】 在某些實施例中，藉由使生物樣本經歷至少一個陰離子交換分離步驟來產生感興趣之蛋白質。在一種情境下，陰離子交換步驟可在親和力層析程序(*例如*，蛋白 A 親和)之後進行。在其他情境下，陰離子交換步驟可在親和力層析步驟之前進行。在其他方案中，陰離子交換可在親和力層析步驟之前及之後進行。在一態樣中，感興趣之蛋白質為阿柏西普或 MiniTrap。

【0387】 相對於陽離子交換材料而言，陰離子交換材料之使用部分基於感興趣之蛋白質的局部電荷。陰離子交換層析可與以下其他層析程序組合使用：諸如親和力層析、尺寸排阻層析、疏水性相互作用層析以及熟練技術人員已知之其他層析模式。

【0388】 在進行分離時，可藉由使用多種技術中之任一者，例如使用批式生產技術或層析技術，使初始蛋白質組合物(生物樣本)與陰離子交換材料接觸。

【0389】 在批式生產之情境下，在所需起始緩衝液中製備或平衡陰離子交換材料。製備後，獲得陰離子交換材料之漿料。使生物樣本與漿料接觸，以使蛋白質吸附於陰離子交換材料上。藉由使漿料沉降並移除上清液，自漿料中分離出包含不與 AEX 材料結合之酸性種類的溶液。漿料可經歷一或多個洗滌步驟及/或溶析步驟。

【0390】 在層析分離之情境下，層析管柱用於容納層析載體材料(樹脂或固相)。將包含感興趣之蛋白質的樣本加載至特定層析管柱上。接著管柱可經歷一或多個使用合適的洗滌緩衝液之洗滌步驟。未吸附於樹脂上之樣本組分可能會流過管柱。可使用適當的溶析緩衝液對已吸附於樹脂上的組分進行差異溶析。

【0391】 通常在 AEX 層析中使用類似於加載條件之條件或替代地藉由以逐步或線性梯度方式降低洗滌液之 pH 值及/或提高其離子強度/電導率來進行洗滌步驟。在一態樣中，在加載緩衝液及洗滌緩衝液中使用的鹽水溶液之 pH 處於或接近感興趣之蛋白質的等電點(pI)。通常，pH 比感興趣之蛋白質的 pI 高或低約 0 至 2 個單位，但其範圍可為高或低 0 至 0.5 個單位。其亦可位於感興趣之蛋白質的 pI 處。

【0392】 陰離子劑可選自由乙酸鹽、氯化物、甲酸鹽及其組合組成之群。陽離子劑可選自由 Tris、精胺酸、鈉及其組合組成之群。在一具體實例中，緩衝溶液為 Tris/甲酸鹽緩衝液。緩沖液可選自由以下組成之群：吡啶、哌哄、L-組胺酸，Bis-tris、Bis-Tris 丙烷、咪唑、N-乙基嗎福啉、TEA (三乙醇胺)、Tris、嗎福啉、N-甲基二乙醇胺、AMPD (2-胺基-2-甲基-1,3-丙二醇)、二乙醇胺、乙醇胺、AMP (2-胺基-2-甲基-1-丙醇)、哌哄、1,3-二胺基丙烷及哌啶。

【0393】 填充式陰離子交換層析管柱、陰離子交換膜裝置、陰離子交換整體式裝置或深度過濾器介質可以結合-溶析模式、流通模式或混合模式操作，其中蛋白質呈現與層析材料之結合且仍可使用與加載緩衝液相同或實質上相似之緩衝液自該材料上洗去。

【0394】 在結合-溶析模式下，首先在某些蛋白質會吸附於基於樹脂之基質上之條件下，使用具有適當離子強度及 pH 值之緩衝液對管柱或膜裝置進行調節。例如，在進料加載期間，由於靜電吸引，感興趣之蛋白質可吸附於樹脂上。在用平衡緩衝液或具有不同 pH 值及/或電導率之另一種緩衝液洗滌管柱或膜裝置後，藉由提高溶析緩衝液之離子強度(亦即電導率)以便與溶質競爭陰離子交換基質之帶電位點來實現產物回收。改變 pH 值及由此更改溶質之電荷為達成溶質溶析之另一種方式。電導率或 pH 值之變化可為逐漸的(梯度溶析)或逐步的(分步溶析)。

【0395】 在流通模式下，管柱或膜裝置係在選定之 pH 值及電導率下操作，以使感興趣之蛋白質不會與樹脂或膜結合，而酸性種類將保留在管柱上或與感興趣之蛋白質相比將具有獨特的溶析譜。在此策略之情境下，酸性種類將在合適的條件下與層析材料相互作用或結合，而感興趣之蛋白質及感興趣之蛋白質之某些聚集體及/或片段將流過管柱。

【0396】 陰離子交換樹脂之非限制性實例包括二乙胺基乙基(DEAE)、四級胺乙基(QAE)及四級胺(Q)基團。另外的非限制性實例包括：Poros 50PI 及 Poros 50HQ，其為剛性聚合物珠粒，其中主鏈由交聯聚[苯乙烯-二乙烯苯]組成；Capto Q Impres 及 Capto DEAE，其為高流動性瓊脂糖珠粒；Toyopearl QAE-550、Toyopearl DEAE-650 及 Toyopearl GigaCap Q-650，其為聚合物基珠粒；Fractogel® EMD TMAE Hicap，其為具有觸手離子交換劑之合成聚合樹脂；Sartobind STIC® PA nano，其為具有一級胺配位體之耐鹽層析膜；Sartobind Q nano，其為強陰離子交換層析膜；CUNO BioCap，其為由無機助濾劑、精製纖維素及離子交換樹脂構成之 zeta-plus 深度過濾器介質；以及 XOHC，其為由無機助濾劑、纖維素及混合纖維素酯構成之深度過濾器介質。

【0397】 在某些實施例中，可將樣本之蛋白質加載量調整至以下管柱之總蛋白質加載量：介於約 50 g/L 與約 500 g/L 之間、或介於約 75 g/L 與約 350 g/L 之間、或介於約 200 g/L 與約 300 g/L 之間。在其他實施例中，將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至加載於管柱上的材料之以下蛋白質濃度：介於約 0.5 g/L 與約 50 g/L 之間、介於約 1 g/L 與約 20 g/L 之間、或介於約 3 g/L 與

約 10 g/L 之間。在其他實施例中，將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至加載於管柱上的材料之約 37 g/L 蛋白質濃度。

【0398】　可添加添加劑，諸如聚乙二醇(PEG)、清潔劑、胺基酸、糖、離液劑，以增強分離性能，從而實現更好的分離、回收及/或產物品質。

【0399】　在某些實施例中，包括與阿柏西普及/或 VEGF MiniTrap 有關之彼等實施例，本發明之方法可用於選擇性地移除、顯著減少或基本上移除至少 10%之蛋白質變異體，從而產生具有減少的蛋白質變異體之蛋白質組合物。

【0400】　蛋白質變異體可包括如下一或多個殘基之修飾：一或多個天冬醯胺經脫醯胺；一或多個天冬胺酸轉化為天冬胺酸-甘胺酸及/或 Asn-Gly；一或多個甲硫胺酸經氧化；一或多個色胺酸轉化為 N-甲醯基犬尿胺酸；一或多個色胺酸為單羥基色胺酸；一或多個色胺酸為二羥基色胺酸；一或多個色胺酸為三羥基色胺酸；一或多個精胺酸轉化為 Arg 3-去氧葡醛酮糖；C 端甘胺酸不存在；及/或存在一或多個非醣化糖位點。亦觀察到使用 AEX 可減少該親和析出液中的抗 VEGF 變異體之氧化及酸性種類。與親和析出液相比，在使用 AEX 後，流通級分可展示出抗 VEGF 變異體之氧化及/或酸性種類至少約 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%或 5%之減少。

【0401】　阿柏西普及/或 VEGF MiniTrap 之蛋白質變異體可包括以下一或多者：(i)來自選自 His86、His110、His145、His209、His95、His19 及/或 His203 之組胺酸殘基的經氧化組胺酸；(ii)選自在 Trp58 及/或 Trp138 處之色胺酸殘基的經氧化色胺酸殘基；(iii)在 Tyr64 處之經氧化酪胺酸殘基；(iv)選自 Phe44 及/或 Phe166 之經氧化苯丙胺酸殘基；及/或(v)選自 Met10、Met 20、Met163 及/或 Met192 之經氧化甲硫胺酸殘基。

D. 陽離子交換層析

【0402】　本發明之組合物可藉由使包含感興趣之蛋白質的生物樣本經歷至少一個陽離子交換(CEX)步驟來產生。在某些例示性實施例中，CEX 步驟將為 AEX 步驟之補充，並且在 AEX 步驟之前或之後進行。在一態樣中，感興趣之蛋白質為阿柏西普、MiniTrap 或與其相關之分子。

【0403】　陽離子交換材料相對於陰離子交換材料(諸如上文討論之彼等陰離子交換材料)之使用部分基於給定溶液中感興趣之蛋白質的局部電荷及所需分離條件。在使用陰離子交換步驟之前採用陽離子交換步驟，或在使用陽離子交換步驟之前採用陰離子交換步驟皆在本發明之範疇內。此外，僅採用陽離子交換步驟與其他層析程序之組合在本發明之範疇內。

【0404】　在進行陽離子交換時，可藉由使用以下多種技術中之任一種將包含感興趣之蛋白質的樣本與陽離子交換材料接觸，例如，使用批式生產技術或層析技術，如上文針對 AEX 所述。

【0405】　鹽水溶液既可用作加載緩衝液亦可用作洗滌緩衝液，其 pH 值低於感興趣之蛋白質的等電點(pI)。在一態樣中，pH 值比蛋白質之 pI 低約 0 至 5 個單位。在另一態樣中，其在比蛋白質之 pI 低 1-2 個單位之範圍內。在仍另一態樣中，其在比蛋白質之 pI 低 1 至 1.5 個單位之範圍內。

【0406】　在某些實施例中，增加或減少鹽水溶液中陰離子劑之濃度以達到以下 pH 值：介於約 3.5 與約 10.5 之間、或介於約 4 與約 10 之間、或介於約 4.5 與約 9.5 之間、或介於約 5 與約 9 之間、或介於約 5.5 與約 8.5 之間、或介於約 6 與約 8 之間、或介於約 6.5 與約 7.5 之間。在一態樣中，增加或減少鹽水溶液中陰離子劑之濃度以達到 5、或 5.5、或 6、或 6.5、或 6.8、或 7.5 之 pH 值。適用於 CEX 方法中的緩衝液系統包括但不限於 Tris 甲酸鹽、Tris 乙酸鹽、硫酸銨、氯化鈉及硫酸鈉。

【0407】　在某些實施例中，藉由提高或降低陽離子劑之濃度來調節鹽水溶液之電導率及 pH 值。在一態樣中，陽離子劑維持在約 20 mM 至約 500 mM、約 50 mM 至約 350 mM、約 100 mM 至約 300 mM 或約 100 mM 至約 200 mM 之濃度範圍內。陽離子劑之非限制性實例係選自由以下組成之群：鈉、Tris、三乙胺、銨、精胺酸及其組合。

【0408】　填充式陽離子交換層析管柱或陽離子交換膜裝置可以結合-溶析模式、流通模式或混合模式操作，其中產物呈現與層析材料之結合或相互作用，但仍可使用與加載緩衝液相同或實質上相似之緩衝液自該材料上洗去(上面概述此等模式之詳情)。

【0409】 陽離子取代基包括羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸鹽(P)及磺酸鹽(S)。另外的陽離子材料包括但不限於：Capto SP ImpRes，其為高流動性瓊脂糖珠粒；CM Hyper D 等級 F，其為陶瓷珠粒，用功能化水凝膠包被及滲透，250-400 個離子基團 μeq/ mL；Eshmuno S，其為具有 50-100 μeq/mL 離子容量之親水性聚乙烯基醚基礎基質；Nuvia C Prime，其為由大孔高度交聯之親水性聚合物基質構成的疏水性陽離子交換介質，55-75 με/mL；Nuvia S，其具有 UNOsphere 基礎基質，90 -150 με/mL 離子基團；Poros HS，其為剛性聚合物珠粒，其中主鏈由交聯聚[苯乙烯-二乙烯苯]組成；Poros XS，其為剛性聚合物珠粒，其中主鏈由交聯聚[苯乙烯-二乙烯苯]組成；Toyo Pearl Giga Cap CM 650M，其為聚合物基珠粒，具有 0.225 meq/mL 離子容量；Toyo Pearl Giga Cap S 650M，其為聚合物基珠粒；Toyo Pearl MX TRP，其為聚合物基珠粒。注意到本文所述之 CEX 層析可與 MM 樹脂一起使用。

【0410】 將包含感興趣之蛋白質的樣本之蛋白質加載量調整至以下管柱之總蛋白質加載量：介於約 5 g/L 與約 150 g/L 之間、或介於約 10 g/L 與約 100 g/L 之間、介於約 20 g/L 與約 80 g/L 之間、介於約 30 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 40 g/L 與約 50 g/L 之間。在某些實施例中，將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至有待加載於管柱上的以下材料之蛋白質濃度：介於約 0.5 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 1 g/L 與約 20 g/L 之間。

【0411】 可添加添加劑，諸如聚乙二醇、清潔劑、胺基酸、糖、離液劑，以增強分離性能，從而實現更好的分離、回收及/或產物品質。

【0412】 在某些實施例中，包括與阿柏西普或抗 VEGF 抗體或 VEGF MiniTrap 有關之彼等實施例，本發明之方法可用於選擇性地移除、顯著減少或基本上移除樣本中所有的側氧基變異體，其中感興趣之蛋白質基本上將在 CEX 程序之流通液中，而側氧基變異體實質上將由管柱介質捕獲。

E. 混合模式層析

【0413】 混合模式(「MM」)層析亦可用於製備本發明之組合物。MM 層析，在本文中亦稱為「多模式層析」，為一種層析策略，其利用包含配位體之載體，該配位體能夠提供與樣本中的感興趣之分析物或蛋白質之至少兩種不同的相互作用。此等位點中之一者在配位體與感興趣之蛋白質之間提供有吸引

力的電荷-電荷相互作用類型，而另一位點提供電子受體-予體相互作用及/或疏水及/或親水相互作用。電子予體-受體相互作用包括諸如氫鍵、π-π、陽離子-π、電荷轉移、偶極-偶極、感應偶極等相互作用。

【0414】 用於混合模式分離之管柱樹脂可為 Capto Adhere。Capto Adhere 為為具有多模式功能之強陰離子交換劑。其基礎基質為具有配位體(N-苄基-N-甲基乙醇胺)之高度交聯的瓊脂糖，該配位體呈現出不同的相互作用功能，諸如離子相互作用、氫鍵及疏水性相互作用。在某些態樣中，用於混合模式分離之樹脂係選自 PPA-HyperCel 及 HEA-HyperCel。PPA-HyperCel 及 HEA-HyperCel 之基礎基質為高孔隙度之交聯纖維素。它們的配位體分別為苯丙胺及己胺。苯丙胺及己胺為蛋白質分離提供不同選擇性及疏水性選擇。額外混合模式層析載體包括但不限於 Nuvia C Prime、Toyo Pearl MX Trp 650M 及 Eshmuno® HCX。在某些態樣中，混合模式層析樹脂係由直接或經由間隔體與有機或無機載體(有時稱為基礎基質)偶聯之配位體構成。載體可呈以下形式：顆粒，諸如基本上呈球形之顆粒、整料、過濾器、膜、表面、毛細管及其類似物。在某些態樣中，載體係由天然聚合物諸如交聯碳水化合物材料諸如瓊脂糖、瓊脂、纖維素、聚葡糖、殼聚醣、蒟蒻、角叉菜膠、結冷膠、藻酸鹽及其類似物製備。為了獲得高吸附能力，載體可為多孔的，接著將配位體偶聯至外表面以及孔表面。此等天然聚合物載體可根據標準方法製備，諸如反相懸浮凝膠化(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964)，其全部教導皆以引用之方式併入本文)。替代地，載體可由合成聚合物諸如交聯合成聚合物，例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯苯、丙烯醯胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯醯胺及其類似物製備。此等合成聚合物可根據標準方法產生，參見「Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization」 (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)，其全部教導皆以引用之方式併入本文)。多孔天然或合成聚合物載體亦可由商業來源獲得，諸如 GE Healthcare, Uppsala, Sweden。

【0415】 可將包含感興趣之蛋白質的生物樣本混合物之蛋白質加載量調整至以下管柱之總蛋白質加載量：介於約 25 g/L 與約 750 g/L 之間、或介於約 75 g/L 與約 500 g/L 之間、或介於約 100 g/L 與約 300 g/L 之間。在某些例示

性實施例中，將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至加載於管柱上的材料之以下蛋白質濃度：介於約 1 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 9 g/L 與約 25 g/L 之間。

【0416】　可添加添加劑，諸如聚乙二醇、清潔劑、胺基酸、糖、離液劑，以增強分離性能，從而實現更好的分離、回收及/或產物品質。

【0417】　在某些實施例中，包括與阿柏西普及/或 MiniTrap 有關之彼等實施例，本發明之方法可用於選擇性地移除、顯著減少或基本上移除所有 PTM，包括側氧基變異體。

【0418】　用於產生本發明之組合物的方法亦可以連續層析模式實施。在此模式下，使用至少兩個管柱(稱為「第一」管柱及「第二」管柱)。在某些實施例中，可進行此連續層析模式，以使得溶析級分及/或汽提級分(包含 PTM，例如側氧基變異體)可隨後或同時加載於第二管柱上(有或無稀釋)。

【0419】　在一實施例中，用於連續模式之介質選擇可為具有側懸疏水及陰離子交換官能基之許多層析樹脂、整料介質、膜吸附介質或深度過濾介質中之一種。

F. 疏水性相互作用層析

【0420】　本發明之組合物亦可使用疏水性相互作用層析(HIC)來製備。

【0421】　在進行分離時，例如使用批式生產技術或使用管柱或膜層析使生物樣本與 HIC 材料接觸。在 HIC 處理之前，可能需要調整鹽緩衝液之濃度以達成所需蛋白質與樹脂或膜之結合/相互作用。

【0422】　離子交換層析依賴於感興趣之蛋白質之局部電荷來進行選擇性分離，而疏水性相互作用層析則利用蛋白質之疏水特性來實現選擇性分離。蛋白質上或蛋白質內的疏水基團與層析樹脂或膜之疏水基團相互作用。通常，在合適的條件下，蛋白質(或蛋白質之一部分)之疏水性越強，其與管柱或膜之相互作用就越強。因此，在合適的條件下，HIC 可用於促進樣本中的過程相關之雜質(例如，HCP)以及產物相關之物質(例如，聚集體及片段)與感興趣之蛋白質之分離。

【0423】　如同離子交換層析一樣，HIC 管柱或 HIC 膜裝置亦可在溶析模式、流通模式或混合模式下操作，其中產物呈現出與層析材料之結合或相互

作用，而仍可使用與加載緩衝液相同或實質上相似之緩衝液自該材料上洗去。(上面結合 AEX 處理概述了此等模式之詳情。)由於疏水性相互作用在高離子強度下最強，所以此種分離形式宜在鹽溶析步驟(諸如通常與離子交換層析結合使用之彼等)之後進行。替代地，可在採用 HIC 步驟之前將鹽添加至樣本中。高鹽濃度有利於蛋白質吸附於 HIC 管柱上，但實際濃度可將視感興趣之蛋白質之性質、鹽類型及所選的特定 HIC 配位體而定在很大範圍內變化。視它們係促進疏水性相互作用(鹽析效應)抑或破壞水之結構(離液效應)並導致疏水性相互作用減弱而定，各種離子可以所謂的疏溶(soluphobic)系列排列。根據遞增之鹽析效應將陽離子排序為 Ba^{2+}；Ca^{2+}；Mg^{2+}；Li^{+}；Cs^{+}；Na^{+}；K^{+}；Rb^{+}；$NH4^{+}$，而陰離子可根據遞增之離液效應經排序為 PO_4^{3-}；SO_4^{2-}；$CH_3CO_3^{-}$；Cl^{-}；Br^{-}；NO_3^{-}；ClO_4^{-}；I^{-}；SCN^{-}。

【0424】 一般而言，Na^{+}、K^{+}或 $NH4^{+}$硫酸鹽使用 HIC 有效促進配位體-蛋白質相互作用。可如以下關係所給出來調配影響相互作用強度之鹽：$(NH_4)_2SO_4 > Na_2SO_4 > NaCl > NH_4Cl > NaBr > NaSCN$。通常，介於約 0.75 M 與約 2 M 之間的硫酸銨或介於約 1 M 與約 4 M 之間的 NaCl 之鹽濃度係有用的。

【0425】 HIC 介質通常包含疏水性配位體(*例如*烷基或芳基)與之偶聯的基礎基質(例如，交聯瓊脂糖或合成共聚物材料)。合適的 HIC 介質包含經苯基官能化之瓊脂糖樹脂或膜(例如，來自 GE Healthcare 之 Phenyl Sepharose™或來自 Sartorius 之 Phenyl Membrane)。許多 HIC 樹脂係市售的。實例包括但不限於：Capto Phenyl、具有低或高取代之 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 、Phenyl Sepharose™ High Performance、Octyl Sepharose™ High Performance (GE Healthcare)；Fractogel™ EMD Propyl 或 Fractogel™ EMD Phenyl (E. Merck, Germany)；Macro-Prep™甲基或 Macro-Prep™第三丁基管柱(Bio-Rad, California)；WP HI- Propyl (C3)™ (J. T. Baker, New Jersey)；以及 Toyopearl™ 醚、苯基或丁基(TosoHaas, PA)；ToyoScreen PPG；ToyoScreen Phenyl；ToyoScreen Butyl；ToyoScreen Hexyl；GE HiScreen 及 Butyl FF HiScreen Octyl FF。

【0426】 將包含感興趣之蛋白質的樣本之蛋白質加載量調整至以下管柱之總蛋白質加載量:介於約 50 g/L 與約 1000 g/L 之間、介於約 5 g/L 與約 150 g/L 之間、介於約 10 g/L 與約 100 g/L 之間、介於約 20 g/L 與約 80 g/L 之間、介於約 30 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 40 g/L 與約 50 g/L 之間。在某些實施例中,將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至有待加載於管柱上的以下材料之蛋白質濃度:介於約 0.5 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 1 g/L 與約 20 g/L 之間。

【0427】 由於為任何特定生產過程選擇之 pH 值必須與蛋白質之穩定性及活性相容,因此特定的 pH 值條件對每種應用可為特定的。然而,由於在 pH 5.0-8.5 時,特定的 pH 值對 HIC 分離之最終選擇性及解析度影響極小,因此此等條件可為有利的。pH 值之增加削弱疏水性相互作用,並且在 pH 值高於 8.5 或低於 5.0 時,蛋白質之保留發生更劇烈之變化。此外,離子強度之變化、有機溶劑之存在、溫度及 pH 值(特別是當沒有淨表面電荷時,在等電點 pI 下)會影響蛋白質之結構及溶解性,並由此影響與其他疏水性表面(諸如在 HIC 介質中之彼等)之相互作用,且因此,在某些實施例中,本發明結合生產策略,其中對上述一或多者進行調整,以實現過程相關之雜質及/或產物相關之物質的所需減少。

【0428】 在某些實施例中,可使用光譜法,諸如 UV、NIR、FTIR、螢光、拉曼,從而以隨線(on-line)、近線(at-line)或在線(in-line)模式監測感興趣之蛋白質及雜質,接著可將其用於控制自 HIC 吸附劑流出物中收集的彙集材料中之聚集體水準。在某些實施例中,可在層析步驟之流出管線上或在收集容器中使用隨線、近線或在線監測方法,以實現所需產物之品質/回收。在某些實施例中,UV 信號可用作替代品以實現適當的產物品質/回收,其中 UV 信號可經適當處理,包括但不限於諸如積分、微分、移動平均值之類的處理技術,以使得可解決正常過程可變性並且可實現目標產物品質。在某些實施例中,此等量測可與在線稀釋方法組合,以使得加載/洗滌液之離子濃度/電導率可藉由反饋來控制,且因此有助於產物品質控制。

G. 尺寸排阻層析

【0429】　尺寸排阻層析或凝膠過濾依賴於隨分子尺寸而變的組分之分離。分離視與流體中之時間相比，物質在多孔固定相中所花費之時間而定。分子將駐留在孔中之概率視分子及孔之尺寸而定。另外，物質滲透至孔中之能力係由大分子之擴散遷移率決定，大分子越小，擴散遷移率越高。極巨大的大分子可能根本不會滲透至固定相之孔中；而且，對於非常小的大分子，滲透之可能性接近於一。較大分子尺寸之組分更快地移動通過固定相，而較小分子尺寸之組分通過固定相之孔的路徑則較長，因此在固定相中之滯留時間更長。

【0430】　層析材料可包含尺寸排阻材料，其中尺寸排阻材料為樹脂或膜。用於尺寸排阻之基質較佳為惰性凝膠介質，其可為交聯多醣，例如呈球形珠粒形式之交聯瓊脂糖及/或聚葡糖之複合物。交聯度決定溶脹之凝膠珠粒中存在的孔之尺寸。大於某一尺寸之分子不會進入凝膠珠粒，且因此最快移動通過層析床。較小之分子，諸如清潔劑、蛋白質、DNA 及其類似物，會根據其尺寸及形狀而不同程度地進入凝膠珠粒，它們通過床時會受到阻礙。因此通常以分子尺寸遞減之順序溶析分子。

【0431】　適用於病毒之尺寸排阻層析的多孔層析樹脂可由具有不同物理特徵之右旋糖、瓊脂糖、聚丙烯醯胺或二氧化矽製成。亦可使用聚合物組合。最常用的為可自 Amersham Biosciences 以商品名「 SEPHADEX」獲得之彼等。來自不同構造材料之其他尺寸排阻載體亦為合適的，例如 Toyopearl 55F (聚甲基丙烯酸酯，來自 Tosoh Bioscience, Montgomery Pa.)及 Bio-Gel P-30 Fine (BioRad Laboratories, Hercules, CA)。

【0432】　可將包含感興趣之蛋白質的樣本之蛋白質加載量調整至以下管柱之總蛋白質加載量：介於約 50 g/L 至約 1000 g/L 之間、介於約 5 g/L 與約 150 g/L 之間、介於約 10 g/L 與約 100 g/L 之間、介於約 20 g/L 與約 80 g/L 之間、介於約 30 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 40 g/L 與約 50 g/L 之間。在某些實施例中，將加載蛋白質混合物之蛋白質濃度調整至有待加載於管柱上的以下材料之蛋白質濃度：介於約 0.5 g/L 與約 50 g/L 之間、或介於約 1 g/L 與約 20 g/L 之間。

H. 病毒過濾

【0433】 病毒過濾為產生過程中專用的病毒減少步驟。此步驟通常在層析精製後進行。可藉由使用合適的過濾器來減少病毒，此等過濾器包括但不限於來自 Asahi Kasei Pharma 之 Planova 20N™、50 N 或 BioEx；來自 EMD Millipore 之 Viresolve™過濾器；來自 Sartorius 之 ViroSart CPV；或來自 Pall Corporation 之 Ultipor DV20 或 DV50™過濾器。熟習此項技術之普通技術人員顯而易見，選擇合適的過濾器以獲得所需過濾性能。

I. 超濾/滲濾

【0434】 本發明之某些實施例採用超濾及滲濾以進一步濃縮及調配感興趣之蛋白質。在以下文獻中詳細描述超濾：Principles and Applications, L. Zeman 及 A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996)；及 Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986；ISBN 號 87762-456-9)；其全部教導皆以引用之方式併入本文。一種過濾方法為如題為「Pharmaceutical Process Filtration Catalogue」第 177-202 頁(Bedford, Mass., 1995/96)之 Millipore 目錄中所述之切向流過濾，該文獻之全部教導皆以引用之方式併入本文。通常認為超濾係指使用孔徑小於 0.1 μm 之過濾器進行的過濾。使用具有如此小之孔徑的過濾器，可藉由使樣本緩衝液滲透通過過濾器膜孔來減少樣本之體積，而蛋白質則保留在膜表面之上。

【0435】 熟習此項技術之普通技術人員可選擇一種合適的膜過濾器裝置用於 UF/DF 操作。適用於本發明之膜盒(membrane cassette)的實例包括但不限於來自 EMD Millipore 的具有 10 kD、30 kD 或 50 kD 膜之 Pellicon 2 或 Pellicon 3 盒；來自 GE Healthcare 的 Kvick 10 kD、30 kD 或 50 kD 膜盒；以及來自 Pall Corporation 的 Centramate 或 Centrasette 10 kD、30 kD 或 50 kD 盒。

J. 例示性生產策略

【0436】 可藉由依次採用 pH 降低、離心及過濾自生產生物反應器收穫物中移除細胞及細胞片段(包括 HCP)來進行初步回收。本發明涉及使來自初步回收的包含感興趣之蛋白質之生物樣本經歷一或多個生產步驟，包括(但無特別順序) AEX、CEX、SEC、HIC 及/或 MM。本發明之某些態樣包括進一步處理步驟。額外的處理程序之實例包括乙醇沉澱、等電聚焦、逆相 HPLC、矽膠層析、肝素 Sepharose™層析、其他陰離子交換層析及/或其他陽離子交

換層析、層析聚焦、SDS-PAGE、硫酸銨沉澱、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析及親和力層析(例如，使用蛋白 A 或 G、抗體、特異性受質、配位體或抗原作為捕獲試劑)。在某些態樣中，可獨立地改變管柱溫度(以及其他參數)以提高分離效率及/或任何特定產生步驟之產率。

【0437】 在某些實施例中，可將未結合之流通及洗滌級分進一步分級分離，並且可彙集提供目標產物純度之級分之組合。

【0438】 管柱加載及洗滌步驟可藉由以下操作來控制：在管柱流出物或收集池或兩者中在線、近線或離線量測產物相關之雜質/物質水準，以達成特定的目標產物品質及/或產率。在某些實施例中，可藉由用緩衝液或其他溶液在線或分批或連續稀釋來動態控制加載濃度，以實現提高分離效率及/或產率所需之分配。

【0439】 此等生產程序之實例描繪於**圖 5-8** 中。

【0440】 **圖 5** 代表用於產生阿柏西普之一個例示性實施例。參看**圖 5**，該方法包含：(a)在 CDM 中培養之宿主細胞中表現阿柏西普；(b)使用可包括親和力捕獲樹脂之第一層析載體捕獲阿柏西普；及(c)使阿柏西普之至少一部分與可包括陰離子交換層析之第二層析載體接觸。步驟(c)可進一步包含洗滌 AEX 管柱及收集包含阿柏西普之樣本之流通級分。視情況，步驟(c)可包含汽提第二層析載體及收集汽提之級分。該等步驟可藉由常規方法聯合上文提及之方法來進行。應理解，熟習此項技術者可能選擇採用 CEX 而非 AEX 或除 AEX 之外亦使用 CEX。亦可不以特定順序採用額外的層析步驟，包括但不限於 HIC 及 SEC。

【0441】 除了**圖 5** 中之例示性實施例之外，其他另外的例示性實施例可包括(d)使步驟(c)之該阿柏西普之至少一部分與第三層析載體接觸。在一態樣中，方案可包括(e)使步驟(d)之至少一部分阿柏西普與第四層析載體接觸。在此實施例之一態樣中，方案可視情況包含使步驟(c)之包含阿柏西普的樣本經歷小於 5.5 之 pH 值。在一態樣中，本方法包含在步驟(a)之前的澄清步驟。

【0442】 **圖 6** 代表用於產生 VEGF MiniTrap 之一個例示性實施例。此方法包含：(a)在 CDM 中培養之宿主細胞中表現阿柏西普；(b)使用可包括親和力層析樹脂之第一層析載體捕獲阿柏西普；(c)切割阿柏西普，從而移除 Fc 域

並形成包含 VEGF MiniTrap 之樣本；(d)使步驟(c)之樣本與可為親和力層析之第二層析載體接觸，以及(e)使步驟(d)之流通液與可包括陰離子交換層析之第三層析載體接觸。步驟(d)包含流通級分之收集，其中由於缺少 Fc 域，MiniTrap 應駐留，而阿柏西普或具有 Fc 域之任何其他蛋白質應基本上與步驟(d)之親和力管柱相互作用。視情況，步驟(d)可包含汽提第三層析載體及收集汽提之級分。此等步驟可藉由常規方法結合以上概述之方法來進行。不以特定順序，可包括額外的層析步驟，包括但不限於諸如 HIC 及 SEC。

【0443】 **圖 7** 代表用於產生阿柏西普之一例示性實施例。此方法包含：(a)在 CDM 中培養之宿主細胞中表現阿柏西普；(b)使用可包括陽離子交換層析之第一層析載體捕獲阿柏西普；及(c)使步驟(b)之流通液與可包括陰離子交換層析之第二層析載體接觸。視情況，步驟(c)可包含汽提第二層析載體及收集汽提之級分。此等步驟可藉由常規方法結合以上提及之方案來進行。不以特定順序，可採用其他層析程序，包括但不限於 HIC 及 SEC。

【0444】 **圖 8** 代表用於產生 VEGF MiniTrap 之一例示性實施例。此方法包含：(a)在 CDM 中培養之宿主細胞中表現阿柏西普；(b)使用可包括離子交換層析之第一層析載體捕獲阿柏西普；(c)對(b)之包含阿柏西普的流通級分進行親和力層析；溶析，其中溶析液包含阿柏西普；(d)使(c)之阿柏西普經歷切割活性，從而切割 Fc 域，由此形成 VEGF MiniTrap。在一態樣中，步驟(b)之離子交換包含 AEX。替代地，步驟(b)可包含 CEX。不以特定順序，可包括額外的層析步驟，諸如步驟(d)之後的其他離子交換層析步驟、HIC 及/或 SEC 之添加。

VII. 包含組合物之醫藥調配物

【0445】 本發明亦揭示包含抗 VEGF 組合物(如上所述)之調配物。抗 VEGF 蛋白之合適的調配物包括但不限於以下專利中所述之調配物：美國專利第 7,608,261 號、美國專利第 7,807,164 號、美國專利第 8,092,803 號、美國專利第 8,481,046 號、美國專利第 8,802,107 號、美國專利第 9,340,594 號、美國專利第 9,914,763 號、美國專利第 9,580,489 號、美國專利第 10,400,025 號、美國專利第 8,110,546 號、美國專利第 8,404,638 號、美國專利第 8,710,004 號、美國專利第 8,921,316 號、美國專利第 9,416,167 號、美國專利第 9,511,140

號、美國專利第 9,636,400 號及美國專利第 10,406,226 號，其皆以引用之方式全部併入本文。

【0446】 上游製程技術(在上文部分 IV 中描述)及下游製程技術(在上文部分 V 中描述)可單獨使用或彼此組合使用以實現調配物產生。

【0447】 本發明揭示包含抗 VEGF 組合物及一或多種成分/賦形劑之調配物以及其使用方法及製備此等組合物之方法。在本發明之一實施例中，本發明之醫藥調配物具有約 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1 或 6.2 之 pH 值。

【0448】 為了製備抗 VEGF 組合物之醫藥調配物，將抗 VEGF 組合物與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑混合。參見，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984)；Hardman 等人(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.；Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.；Avis 等人(編著) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY；Lieberman 等人(編著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY；Lieberman 等人(編著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, N.Y.；Weiner 及 Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.；其全部教導皆以引用之方式併入本文。在本發明之一實施例中，醫藥調配物為無菌的。

【0449】 本發明之醫藥調配物包括抗 VEGF 組合物及醫藥學上可接受之載劑，包括例如水、緩沖劑、防腐劑及/或清潔劑。

【0450】 本發明提供一種醫藥調配物，其包含本文所列之抗 VEGF 組合物中之任一者及醫藥學上可接受之載劑，例如，其中多肽之濃度為約 40 mg/mL、約 60 mg/mL、約 80 mg/mL、90 mg/mL、約 100 mg/mL、約 110 mg/mL、約 120 mg/mL、約 130 mg/mL、約 140 mg/mL、約 150 mg/mL、約 200 mg/mL 或約 250 mg/mL。

【0451】 本發明之範疇包括經乾燥、例如經冷凍乾燥之組合物，其包含抗 VEGF 蛋白及實質上(約 85%至約 99%或更高)無水之醫藥學上可接受之載劑。

【0452】 在一實施例中，根據 Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 第 57 版(2002 年 11 月 1 日)，其全部教導皆以引用之方式併入本文)，將與本文揭示之抗 VEGF 組合物聯合向個體投與之另一種治療劑向個體投與。

【0453】 本發明提供一種容器(例如，具有蓋之塑料或玻璃小瓶或層析管柱、中空針或注射器筒)，其包含本文所述之抗 VEGF 組合物中之任一者或包含醫藥學上可接受之載劑的醫藥調配物。本發明亦提供一種包含本文所述之抗 VEGF 組合物或調配物之注射裝置，例如注射器、預填充注射器或自動注射器。在一態樣中，將容器染色(例如棕色)以遮擋自然光或其他光。

【0454】 本發明包括包含抗 VEGF 組合物以及一或多種其他治療劑之組合。抗 VEGF 組合物及其他治療劑可在單一組合物中或在單獨組合物中。例如，治療劑為 Ang-2 抑制劑(例如奈斯單抗(nesvacumab))、Tie-2 受體活化劑、抗 PDGF 抗體或其抗原結合片段、抗 PDGF 受體或 PDGF 受體 β 抗體或其抗原結合片段及/或另外的 VEGF 拮抗劑，諸如阿伯西普(abribercept)、康柏西普(conbercept)、貝伐單抗(bevacizumab)、雷尼單抗(ranibizumab)；抗 VEGF 適體，諸如哌加他尼(pegaptanib)(例如，哌加他尼鈉)；單鏈(例如，VL-VH)抗 VEGF 抗體，諸如溴珠單抗(brolucizumab)；抗 VEGF DARPin，諸如 Abicipar Pegol DARPin；雙特異性抗 VEGF 抗體，例如其亦與 ANG2 結合，諸如 RG7716；或可溶形式的包含胞外域 1-3 之人類血管內皮生長因子受體 3 (VEGFR-3)，表示為 Fc 融合蛋白。

VIII. 治療方法

【0455】 本發明提供用於在個體中治療或預防癌症(例如，其生長及/或轉移至少部分地由 VEGF 介導，例如 VEGF 介導之血管生成)或血管生成性眼部病症的方法，其包含投與治療有效量的本文(前述部分 III)所揭示之組合物。

【0456】 上游製程技術(前述部分 IV)及下游製程技術(前述部分 V 及 VI)可單獨使用或相互組合使用，以產生如部分 III 中所述之組合物及/或如部分 VII 中所述之調配物，其可用於治療或預防多種病症，包括眼科及腫瘤疾病。

【0457】 本發明亦提供一種向個體(例如人類)投與本文(部分 III 及 VII)所述之組合物的方法，其包含將在不多於約 100 μL，例如約 50 μL、約 70 μL 或約 100 μL 中具有約 0.5 mg、2 mg、4 mg、6 mg、8 mg、10 mg、12 mg、14 mg、16 mg、18 mg 或 20 mg 感興趣之蛋白質(例如阿柏西普或 MiniTrap)及視情況選用之另一治療劑的組合物藉由例如眼內注射(諸如藉由玻璃體內注射)引入個體體內。

【0458】 本發明提供一種在有此需要之個體中治療癌症(其生長及/或轉移至少部分地由 VEGF 介導，例如 VEGF 介導之血管生成)或血管生成性眼部病症的方法，該方法包含向個體投與治療有效量的本文(以上部分 III 及部分 VII)所述之組合物，例如，在不多於約 100 μl 中的 2 mg、4 mg、6 mg、8 mg 或 10 mg 感興趣之蛋白質及視情況選用之另一治療劑。在本發明之一實施例中，藉由玻璃體內注射進行投與。可使用本文之方法治療或預防之血管生成性眼部病症之非限制性實例包括：

- 年齡相關之黃斑變性(例如，濕性或乾性)，
- 黃斑水腫，
- 視網膜靜脈阻塞後之黃斑水腫，
- 視網膜靜脈阻塞(RVO)，
- 視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)，
- 視網膜分支靜脈阻塞(BRVO)，
- 糖尿病性黃斑水腫(DME)，
- 脈絡膜新生血管形成(CNV)，
- 虹膜新生血管形成，
- 新生血管性青光眼，
- 青光眼手術後纖維化，
- 增生性玻璃體視網膜病(PVR)，
- 視盤新生血管形成，

- 角膜新生血管形成，
- 視網膜新生血管形成，
- 玻璃體新生血管形成，
- 角膜翳，
- 翼狀胬肉，
- 血管性視網膜病，
- 在患有糖尿病性黃斑水腫之個體中的糖尿病性視網膜病；以及
- 糖尿病性視網膜病(例如非增生性糖尿病性視網膜病(例如，以約 47 或 53 之糖尿病性視網膜病嚴重程度量表(DRSS)分級為特徵)，或增生性糖尿病性視網膜病；例如，在不患有 DME 之個體中)。

【0459】 此等組合物或調配物(部分 III 及部分 VII)之投與方式可由熟練從業者改變及確定。投與途徑包括腸胃外、非腸胃外、經口、直腸、經黏膜、腸、腸胃外、肌內、皮下、皮內、髓內、鞘內、直接心室內、靜脈內、腹膜內、鼻內、眼內、吸入、吹入、表面、皮膚、眼內、玻璃體內、經皮或動脈內。

【0460】 在本發明之一實施例中，本發明之醫藥調配物(包括本發明之組合物或調配物)之玻璃體內注射包括以下步驟：用包含調配物之注射器及針(*例如* 30 號注射針)刺穿眼睛，及將調配物(例如，小於或等於約 100 微升；約 40、50、55、56、57、57.1、 58、60 或 70 微升)以足量體積注入眼玻璃體中以便遞送本文所述之治療有效量，例如約 2、4、6、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8 或 8.9、10 或 20 mg 的感興趣之蛋白質。視情況，該方法包括以下步驟：向所注射之眼睛投與局部麻醉劑(例如，丙美卡因(proparacaine)、利多卡因(lidocaine)或四卡因(tetracaine))、抗生素(例如，氟喹諾酮(fluoroquinolone))、防腐劑(例如，聚維酮-碘)及/或瞳孔擴張劑。在一態樣中，在注射之前，在有待注射之眼睛周圍建立無菌區。玻璃體內注射後，監測個體之眼內壓升高、發炎及/或血壓。

【0461】 用於血管生成性眼部病症的感興趣之蛋白質之有效或治療有效量係指足以引起癌症或血管生成性眼部病症之消退、穩定或消除的感興趣之蛋白質之量，例如，藉由使癌症或血管生成性眼部病症之一或多種症狀或症候

以任何臨床上可量測之程度消退、穩定或消除(例如，關於血管生成性眼部病症)；藉由使糖尿病性視網膜病嚴重程度評分(DRSS)降低或維持；藉由改善或維持視力(例如，最佳矯正視力，如藉由 ETDRS 字母之增加來量度)；增加或維持視野及/或減小或維持中央視網膜厚度；以及就癌症而言，停止或逆轉個體中的癌細胞之生長、存活及/或轉移。

【0462】 在本發明之一實施例中，用於治療或預防血管生成性眼部病症的感興趣之蛋白質(諸如阿柏西普)的有效或治療有效量為約 0.5 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、7.25 mg、7.7 mg、7.9 mg、8.0 mg、8.1 mg、8.2 mg、8.3 mg、8.4 mg、8.5 mg、8.6 mg、8.7 mg、8.8 mg、8.9 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg 或 20 mg，例如，在不多於約 100 μL 中。該量可根據有待投與之個體之年齡及體格、靶疾病、疾患、投與途徑及其類似因素而變化。在某些例示性實施例中，可在初始劑量之後投與第二或多個後續劑量的感興趣之蛋白質，該第二或多個後續劑量之量可與初始劑量之劑量大致相同或更少或更多，其中後續劑量間隔至少 1 天至 3 天、至少一週、至少 2 週、至少 3 週、至少 4 週、至少 5 週、至少 6 週、至少 7 週、至少 8 週、至少 9 週、至少 10 週、至少 12 週或至少 14 週。

【0463】 應注意，劑量值可隨著欲減輕的疾患之類型及嚴重性而變化。應進一步理解對於任何特定個體，具體劑量方案應根據個體需求及投與或監督投與該等組合物之人的專業判斷隨時間加以調節，且本文所列舉之劑量範圍僅為例示性的且不意欲限制所主張之組合物之範疇或實踐。

IX. 分析蛋白質變異體之方法

【0464】 使用本文所述之技術產生的層析樣本中之蛋白質變異體之水準可如以下實例中所述來分析。在某些實施例中，使用帶有經碳氟化合物塗覆之毛細管筒(100 μπι x 5 cm)的 iCE3 分析儀(ProteinSimple)來採用 cIEF 方法。兩性電解質溶液係由以下各物在純淨水中之混合物組成：0.35%甲基纖維素(MC)、4% Pharmalyte 3-10 載劑兩性電解質、4% Pharmalyte 5-8 載劑兩性電解質、10 mM L-精胺酸 HCl、24%甲醯胺以及 pI 標記物 5.12 及 9.77。陽極電解液為 80 mM 磷酸，而陰極電解液為 100 mM 氫氧化鈉，均在 0.10%甲基

纖維素中。將樣本在純淨水中稀釋至 10 mg/mL。將樣本與兩性電解質溶液混合，接著藉由引入 1500 V 之電位持續一分鐘，繼之引入 3000 V 之電位持續 7 分鐘來聚焦。藉由使 280 nm 紫外光穿過毛細管並進入電荷耦合裝置數位相機之鏡頭中，獲得聚焦變異體之影像。隨後分析此影像以確定各種電荷變異體之分佈。熟習此項技術者可改變精確參數，同時仍達成期望結果。

【0465】 在整個說明書中引用各種出版物，包括專利、專利申請案、公開的專利申請案、登錄號、技術論文及學術論文。此等引用之參考文獻中之每一篇皆以引用之方式全部併入。

【0466】 本揭露將藉由參考以下實例更充分地理解。然而，它們不應被視為限製本發明之範疇。

實例

【0467】 在實例中討論之 MiniTraps (MT) 1-6 如下：

MT1：藉由切割使用 CDM1 產生之阿柏西普獲得的 VEGF MiniTrap。

MT2：藉由切割使用 CDM2 產生之阿柏西普獲得的 VEGF MiniTrap。

MT3：藉由切割使用 CDM3 產生之阿柏西普獲得的 VEGF MiniTrap。

MT4：藉由切割使用大豆水解物產生之阿柏西普獲得的 VEGF MiniTrap。

MT5：重組 VEGF MiniTrap (二聚物)。

MT6：重組 VEGF MiniTrap (scFv)。

MT1、MT5 及 MT6 之表徵描述於以下實例 8 中。

樣本之顏色評估

【0468】 發現量測 b*值(CIELAB)之分光光度檢定法適合進行顏色評估。

【0469】 在可見光譜(380 至 780 nm)上定量 1 mL 蛋白質樣本之吸光度，並且使用一組矩陣運算將吸光度曲線轉換為 CIELAB 顏色空間。該儀器每小時可處理大約 6 個樣本。該檢定之高通量格式使用 CLARIOstar 讀板儀(BMG Labtech)。使用需要 0.3 mL 樣本之 96 孔板，最多可分析 96 個樣本。

【0470】 為了將 BY 標準轉換為 b*值，使用高通量檢定格式對 BY 參考標準(BY1 至 BY7)進行定量。

【0471】 溶液係按照以上討論之 BY 標準來製備。每個標準之 b*值如**圖 9** 中所示。此方法提供更快的檢定、更少的樣本需求及更短的運行時間，如下

表 3 中所示。對於使用此方法評估之所有樣本，將測試樣本之蛋白質濃度標準化為 5 g/L 或 10 g/L。

表 3.

	原始	**高通量**
量/樣本	1 mL	0.3 mL
量測格式	比色管(單個)	96 孔板(整體)
運行時間	6 個樣本/小時	96 個樣本/5 分鐘
資料輸入	手動	自動
資料存儲	Excel	LIMS

實例 1：使用化學成分確定之培養基產生蛋白質

1.1 細胞來源及收穫

【0472】 在本研究中使用產生阿柏西普之細胞株。使用化學成分確定之培養基(CDM)培養及收穫產生阿柏西普之細胞株。

1.2 阿柏西普之蛋白水解切割

【0473】 將具有經固定之 IdeS 酶(獲自 Genovis (Cambridge, MA)之 FabRICATOR®)的管柱用於產生 MT1。將獲自細胞培養收穫物之阿柏西普(在 1.0 mL 切割緩衝液中之 20 mg)添加至管柱中，並在 18℃下培育 30 min。30 min 後，用切割緩衝液(1.0 mL)洗滌管柱。將消化混合物與洗滌溶液合併。將混合物加載於分析型蛋白 A 親和力管柱(Applied Biosystems™，POROS™ 20 μM 蛋白 A 筒 2.1x30 mm，0.1 mL (目錄號 2-1001-00)上並自其溶析。根據用於 POROS™ 20 μM 蛋白 A 筒 2.1x30 mm，0.1 mL (目錄號 2-1001-00)之 Applied Biosystems'™方案進行處理。管柱高度為 20±1.0 cm，滯留時間為 15 分鐘，且使用 40 mM Tris、54 mM 乙酸鹽 pH 7.0±0.1 進行平衡/洗滌。

實例 2. 陰離子交換層析(AEX)用於使顏色最小化

(A) 使用 AEX 減少顏色形成

【0474】 進行 AEX 層析以移除在使用 CDM1 表現的阿柏西普之產生期間獲得的著色。

2.1 設計

【0475】 如**表 2-1** 中所詳示，使用**表 2-2** 中所述之 AEX 方案對本研究進行五次 AEX 分離。將 15.7 mL Q Sepharose Fast Flow 管柱(19.5 cm 床高，1.0 cm

I.D.)及 14.1 mL POROS 50 HQ 管柱(18.0 cm 床高，1.0 cm I.D.)整合至 AKTA Avant 台式液相層析控制器中。

【0476】 使用 2 M Tris 鹼或 2 M 乙酸將 AEX 加載液之 pH 值調節至目標±0.05 個 pH 單位。使用 5 M 氯化鈉或去離子水將 AEX 加載液之電導率調節至目標±0.1 mS/cm。分析所有彙集樣本之高分子量(HMW)、顏色及產率。

表 2-1. 用於 AEX 顏色減少之研究設計的概述

AEX 分離	評估條件	樹脂
1	pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	POROS 50 HQ
2	pH 7.90 – 8.10，2.40 – 2.60 mS/cm	Q Sepharose FF
3	pH 7.90 – 8.10，2.40 – 2.60 mS/cm	POROS 50 HQ
4	pH 7.70 – 7.90，3.90 – 4.10 mS/cm	Q Sepharose FF
5	pH 7.70 – 7.90，3.90 – 4.10 mS/cm	POROS 50 HQ

表 2-2. 用於顏色減少之 AEX 方案

步驟	說明	流動相	管柱體積 (CV)	線速度 (cm/h)
1	預平衡	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
2	平衡	50 mM Tris，可變 mM NaCl 可變 pH 值及電導率	2	200
3	加載	AEX 加載液 可變 pH 值及電導率	40 g/L-樹脂	200
4	FT/洗滌	50 mM Tris，可變 mM NaCl 可變 pH 值及電導率	2	200
5	汽提 1	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
6	汽提 2	1 N 氫氧化鈉(NaOH)	2	200

2.2 結果

【0477】 將 AEX 分離用於產生會呈現顏色之顯著減少。(表 2-3)。例如，如**表 2-3** 中所見，在 AEX 分離 1 (pH 8.30-8.50，1.90-2.10 mS/cm)之流通液(FT)及洗滌液中觀察到的顏色具有 1.05 之 b*值，而用於 AEX 之加載液(「AEX 加載液」)之顏色具有 3.06 之 b*值。b*值之增加反映樣本之黃棕色著色的強度。

【0478】 進行五次 AEX 分離以評估樹脂(Q Sepharose FF 或 POROS 50 HQ)以及 pH 及電導率設定點(pH 8.40 及 2.00 mS/cm、pH 8.00 及 2.50 mS/cm、或 pH 7.80 及 4.00 mS/cm)對顏色減少之影響。對於 POROS 50 HQ，產率(64.4%、81.9%及 91.4%)及彙集 HMW 水準(1.02%、1.29%及 1.83%)隨著設定點變化為較低 pH 值及較高電導率而提高。顏色(b*值)亦隨著設定點變化為較低 pH

值及較高電導率而增加(1.05、1.33 及 1.55)。對於 POROS 50 HQ 之 AEX 分離，較高之 pH 值及較低之電導率提供最大程度之顏色減少。

【0479】 對於 Q Sepharose Fast Flow，產率(49.5%及 77.7%)及彙集 HMW 水準(0.59%及 1.25%)亦隨著設定點變化為較低 pH 值及較高電導率而提高。顏色(b*值)亦隨著設定點變化為較低 pH 值及較高電導率而增加(0.96 及 1.35)。

【0480】 AEX 之使用減少黃棕色著色-參見**表 2-3**。另外，對於在兩種樹脂上評估之兩個設定點，確定 Q Sepharose Fast Flow 減少之顏色比 POROS 50 HQ 多。在 pH 8.00 及 2.50 mS/cm 設定點下，POROS 50 HQ 池具有 1.33 之 b*值，而 Q Sepharose Fast Flow 池具有 0.96 之 b*值。類似地，在 pH 7.80 及 4.00 mS/cm 設定點下，POROS 50 HQ 池具有 1.55 之 b*值，而 Q Sepharose Fast Flow 池具有 1.35 之 b*值(**表 2-3**)。

表 2-3. AEX 顏色減少研究之實驗結果的概述

AEX 分離	級分	產率 (%)	HMW (%)	顏色 (L*)	顏色 (a*)	顏色 (b*)
1	FT/洗滌	64.4	1.02	98.89	0.01	1.05
2	FT/洗滌	49.5	0.59	98.30	-0.03	0.96
3	FT/洗滌	81.9	1.29	99.07	-0.07	1.33
4	FT/洗滌	77.7	1.25	99.42	-0.04	1.35
5	FT/洗滌	91.4	1.83	99.19	-0.09	1.55
-	過濾池(AEX 加載液)	-	3.66 – 3.98	98.73	-0.21	3.06

AEX，陰離子交換層析；HMW，高分子量種類；N/A，不適用

將級分調節至 10 g/L 之蛋白質濃度以用於顏色量測。

2.3 結論

【0481】 發現 AEX 之使用減少黃棕色著色，*參見***表 2-3**。參看**表 2-3**，AEX 加載液具有 3.06 之 b*值，但在經歷 AEX 層析(AEX 分離 1-5)時，b*值減小表明黃棕色著色之減少。再者，隨著 b*值之減小，著色亦隨之減少；隨著 b*值之增大，其反映了給定樣本中黃棕色之增加。

【0482】 使用兩種 AEX 樹脂(POROS 50 HQ 及 Q Sepharose Fast Flow)以及三個設定點(pH 8.40 及 2.00 mS/cm、pH 8.00 及 2.50 mS/cm、以及 pH 7.80 及 4.00 mS/cm)評估顏色減少。在這兩種樹脂下，對於較高 pH 值及較低電導率之設定點，顏色減少較多。此外，在對兩種樹脂評估之兩個設定點(pH 8.00

及 2.50 mS/cm 以及 pH 7.80 及 4.00 mS/cm)下，Q Sepharose Fast Flow 比 POROS 50 HQ 提供更多的顏色減少。然而，與用於 AEX 之加載溶液(「AEX 加載液」)相比，所有五種 AEX 分離方法均導致顯著的顏色減少，表明在用 CDM 表現之阿柏西普的產生過程中 AEX 產生之重要性。AEX 加載液(濃度為 10 g/L)之初始 b*值可在約 0.5 至約 30 之範圍內、更具體在約 1.0 至約 25.0 之範圍內、及甚至更具體在約 2.0 至約 20.0 之範圍內。使用 AEX 之後，流通液(濃度為 10 g/L)之 b*值可在 0.5 至約 10.0 之範圍內、更具體在約 0.5 至約 7.0 之範圍內、及甚至更具體在約 0.5 至約 5.0 之範圍內。

2.4 肽作圖

【0483】 **樣本製備**。進行自上述實驗(**表 2-3**)之 AEX 加載液及流通液獲得的還原及烷化阿柏西普樣本之胰蛋白酶作圖，以識別及量化翻譯後修飾(PTM)。將每個樣本(加載液及流通液)之等分試樣用 8.0 M 尿素、0.1 M Tris-HCl pH 7.5 變性，用 DTT 還原，接著用碘乙醯胺烷化。首先將經變性、還原及烷化之樣本在 37℃下用重組 Lys-C (rLys-C)以 1:100 (w/w)之酶與受質比率消化 30 分鐘，用 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 稀釋，以使最終尿素濃度為 1.8 M，隨後在 37℃下用胰蛋白酶以 1:20 (w/w)之酶與受質比率消化 2 小時，隨後在 37℃下用 PNGase F 以 1:5 (w/w)之酶與受質比率去醣化 1 小時。藉由使用甲酸(FA)使 pH 值低於 2.0 來中止消化。

【0484】 **LC-MS 分析**。將由每個樣本得到的 rLys-C/胰蛋白酶肽之 20 μg 等分試樣藉由以下來分離及分析：使用 Waters ACQUITY UPLC CSH C18 管柱(130 Å，1.7 μm，2.1×150 mm)進行逆相超高效液相層析(UPLC)，繼之隨線 PDA 偵測(在 280 nm、320 nm 及 350 nm 之波長下)及質譜分析。流動相 A 為在水中之 0.1% FA，而流動相 B 為在乙腈中之 0.1% FA。樣本注入後，梯度以在 0.1% B 下保持 5 分鐘開始，繼之在 75 分鐘內線性增加至 35% B，以實現最佳肽分離。使用 Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap 質譜儀進行 MS 及 MS/MS 實驗，該質譜儀採用高能碰撞解離(HCD)進行用於 MS/MS 實驗之肽片段化。肽身份分配係基於在全 MS 譜中的給定肽之經實驗確定之精確質量以及在相應 HCD MS/MS 譜中之 b 及 y 片段離子。生成來自加載液及流通液之肽之提取離子層析圖(參見**圖 10**)。如**圖 10** 中之提取

離子層析圖中所見，展示在來自 AEX 分離 1-5 的「AEX 加載液」及「AEX FT/洗滌液」中識別之肽片段(如**表 2-3** 中所識別)。來自肽作圖分析的在**圖 10** 中識別之此等肽中之一些的相對豐度示於**圖 11** 中。

【0485】 參看**圖 11**，此圖識別所分析之各種肽片段及其相對氧化水準。具體而言，第三管柱識別經分離及分析之肽片段之胺基酸殘基(「肽序列」)。每個肽序列皆具有加下劃線之胺基酸殘基。加下劃線之胺基酸殘基識別肽序列中經氧化之胺基酸。經氧化之胺基酸對應於組胺酸(H)氧化或色胺酸(W)氧化。此圖中亦描繪每個肽序列右側之列，展示經氧化的種類之豐度。列中之陰影表示使用在相應的行標題中識別之不同 AEX 分離，在特定樣本中之經氧化殘基之相對量的差異。例如，參看**圖 11** 中之第二肽(EIGLLTCEATVNGHLYK)，當以水平方式讀取時，在特定樣本(「阿柏西普 AEX 加載液」)中經氧化之此肽之相對總群體大致 0.013%經氧化。當在同一列上進行時，陰影發生偏移，表明經氧化的種類之相對豐度發生改變。例如，使用此相同的肽序列，當遵循不同 AEX 分離方案時，用於 AEX 分離之經氧化的種類之相對豐度為 0.006%至 0.010%。因此，可理解，AEX 層析降低經氧化的種類之豐度。

(B) 使用 AEX 來減少 MiniTrap 產生中的顏色形成

【0486】 進行 AEX 層析以移除在 MT1 之產生期間獲得之著色，該著色係在進行使用 CDM1 表現之全長阿柏西普的切割後獲得。

2.5 設計

【0487】 如**表 2-4** 中所述，本研究進行 4 次 AEX 分離。自 MT1 之過濾樣本(「MT1 過濾池」)獲得 AEX 加載液。將 15.7 mL Capto Q 管柱(床高 20.0 cm，1.0 cm I.D.)、14.1 mL POROS 50 HQ 管柱(床高 18.0 cm，1.0 cm I.D.)及 16.5 mL Q Sepharose FF 管柱(床高 21.0 cm，1.0 cm I.D.)整合至用於本實驗之 AKTA Avant 台式液相層析控制器中。

【0488】 使用 2 M tris 鹼或 2 M 乙酸將 AEX 加載液之 pH 值調節至目標±0.05 個 pH 單位。使用 5 M 氯化鈉或去離子水將 AEX 加載液之電導率調節至目標±0.1 mS/cm。分析所有彙集樣本之 HMW、顏色及產率。

表 2-4. AEX 顏色減少研究之研究設計的概述

AEX 分離	樹脂	AEX 方案
1	Capto Q	表 2-6
2	POROS 50 HQ	表 2-6
3	Q Sepharose FF	表 2-6
4	POROS 50 HQ	表 2-5

表 2-5. 用於顏色減少研究之流通 AEX 方案

步驟	說明	流動相	管柱體積(CV)	線速度 (cm/h)
1	預平衡	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
2	平衡	50 mM Tris，40 mM NaCl pH 7.90 – 8.10，6.50 – 7.50 mS/cm	2	200
3	加載	AEX 加載液 pH 7.90 – 8.10，6.50 – 7.50 mS/cm	30 g/L-樹脂	200
4	洗滌	50 mM Tris，40 mM NaCl pH 7.90 – 8.10，6.50 – 7.50 mS/cm	2	200
5	汽提 1	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
6	汽提 2	1 N 氫氧化鈉(NaOH)	2	200

AEX，陰離子交換層析；CV，管柱體積

表 2-6. 用於顏色減少研究之結合及溶析 AEX 方案

步驟	說明	流動相	管柱體積(CV)	線速度 (cm/h)
1	預平衡	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
2	平衡	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	2	200
3	加載	AEX 加載液 pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	30 g/L-樹脂	200
4	洗滌	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	2	200
5	溶析	50 mM Tris，70 mM NaCl pH 8.30 – 8.50，8.50 – 9.50 mS/cm	2	200
6	汽提 1	2 M 氯化鈉(NaCl)	2	200
7	汽提 2	1 N 氫氧化鈉(NaOH)	2	200

AEX，陰離子交換層析；CV，管柱體積

2.6 結果

【0489】　如對於 AEX 分離 1-4 之流通液及洗滌液之著色(**表 2-7**)所見，所有四次 AEX 分離均導致顏色減少。雖然前三次 AEX 分離係在結合及溶析模式下評估(**表 2-6**)，但觀察到大部分產物存在於加載及洗滌區(62%– 94%)中。

【0490】　前三次分離評估用於 Capto Q、POROS 50 HQ 及 Q Sepharose FF 脂之 pH 8.4 及 2.0 mS/cm 設定點。所有三次分離均具有良好的產率(> 80%)。

POROS 50 HQ AEX 池展示在 AEX 池中之最低黃色(b*值為 2.09)，繼之為 Q Sepharose FF AEX 池(b*值為 2.22)及 Capto Q AEX 池(b*值為 2.55)。

表 2-7. AEX 顏色減少研究之實驗結果的概述

AEX 分離	級分	產率(%)	HMW (%)	顏色(L*)	顏色(a*)	顏色(b*)
1	FT/洗滌	90.7	0.49	99.11	-0.27	2.55
2	FT/洗滌	93.8	0.33	99.20	-0.28	2.09
3	FT/洗滌	86.7	0.23	98.88	-0.23	2.22
4	FT/洗滌	99.5	1.13	98.90	-0.39	3.40
-	MT1 過濾池 (AEX 加載液)	-	0.65	98.18	-0.37	4.17

AEX，陰離子交換層析；HMW，高分子量種類。

【0491】 將級分調節至 5 g/L 之蛋白質濃度以用於顏色量測。

2.7 結論

【0492】 如對於阿柏西普所見(參見以上部分 2.3)，發現使用 AEX 可減少 MiniTrap 產生之黃棕色著色(**表 2-7**)。參看**表 2-7**，AEX 加載液具有 4.17 之 b*值，但在經歷 AEX 層析(AEX 分離 1-4)時，b*值減小，表明黃棕色著色之減少。再者，隨著 b*值之減小，著色亦隨之減少。AEX 加載液(濃度為 5 g/L)之初始 b*值可在約 0.5 至約 25 之範圍內、更具體在約 1.0 至約 20.0 之範圍內、及甚至更具體在約 1.5 至約 15.0 之範圍內。使用 AEX 之後，流通液(濃度為 5 g/L)之 b*值可在 0.5 至約 10.0 之範圍內、更具體在約 0.5 至約 7.0 之範圍內、及甚至更具體在約 0.5 至約 5.0 之範圍內。

實例 3. 氧化肽研究

【0493】 **3.1 肽作圖**

【0494】 **樣本製備**。進行還原及烷化 MiniTrap (MT1)及 MT4 (類似於 MT1 之 MiniTrap，使用採用大豆水解物細胞培養產生的不同全長阿柏西普)樣本之胰蛋白酶作圖，以識別及量化翻譯後修飾。將樣本之等分試樣使用在 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 中之 8.0 M 尿素變性，用 DTT 還原，接著用碘乙醯胺烷化。將經變性、還原及烷化之原料藥首先在 37℃下用重組 Lys-C (rLys-C)以 1:100 (w/w)之酶與受質比率消化 30 分鐘，用 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 稀釋，以使最終尿素濃度為 1.8 M，隨後在 37℃下用胰蛋白酶以 1:20 (w/w)之酶與受質比

率消化 2 小時，接著在 37℃下用 PNGase F 以 1:5 (w/w)之酶受質比率去醣化 1 小時。藉由使用甲酸(FA)使 pH 值低於 2.0 來中止消化。

【0495】 **LC-MS 分析**。將由每個樣本得到的 rLys-C/胰蛋白酶肽之 20 μg 等分試樣藉由以下來分離及分析：使用 Waters ACQUITY UPLC CSH C18 管柱(130 Å，1.7 μm，2.1×150 mm)進行逆相超高效液相層析(UPLC)，繼之隨線 PDA 偵測(在 280 nm、320 nm 及 350 nm 之波長下)及質譜分析。流動相 A 為在水中之 0.1% FA，而流動相 B 為在乙腈中之 0.1% FA。樣本注入後，梯度以在 0.1% B 下保持 5 分鐘開始，繼之在 75 分鐘內線性增加至 35% B，以實現最佳肽分離。在 Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap 質譜儀上進行 MS 及 MS/MS 實驗，該質譜儀採用高能碰撞解離(HCD)進行用於 MS/MS 實驗之肽片段化。肽身份分配係基於在全 MS 譜中的給定肽之經實驗確定之精確質量以及在相應 HCD MS/MS 譜中之 b 及 y 片段離子。生成氧化肽及相應的天然肽之提取離子層析圖，並對峰面積積分，以計算 MT1 樣本中一或多個經氧化胺基酸殘基之位點特異性百分比。

肽片段與增加的 350 nm 吸光度有關

【0496】 在比較 MT1 與 MT4 之胰蛋白酶肽圖後，觀察到 MT1 上之 PTM (**圖 12A** 展示自 20.0 至 75 分鐘溶析之肽的吸光度)。突顯具有變化之 UV 峰的肽。層析圖之展開視圖示於**圖 12B** 中，該圖展示自 16 至 30 分鐘溶析之肽的吸光度。在 MT1 與 MT4 之間的 UV 吸光度具有強對比之肽為 TNYLTH*R、IIW(+4)DSR 及 IIIW(+132)DSR (*或下劃線表示殘基之氧化)。此外，層析圖之展開視圖示於**圖 12C** 中，該圖展示自 30 至 75 分鐘溶析之肽的吸光度。在 MT1 與 MT4 之間的 UV 吸光度具有強對比之肽為 DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)、TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20)、EIGLLTCEATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18)及 QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) (*表示殘基之氧化)。肽作圖揭示在 VEGF MiniTrap 之間的豐度顯著不同的肽之身份。由肽作圖分析識別的肽之相對豐度示於**表 3-1** 中。MT1 (在 CDM 中產生)中之 2-側氧基-組胺酸之量高於 MT4 (在大豆水解物中產生)，表明用於表現阿柏西普之培養基

可對具有氧化組胺酸或氧化色胺酸之肽之相對豐度具有顯著影響。例如，對於肽 QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)，該肽在 MT1 (在 CDM 中產生)中之相對豐度百分比為 0.015%，與肽在 MT4 (在大豆水解物中產生；其比 MT1 小約 15 倍)中之相對豐度百分比形成對比。

表 3-1.

肽	肽修飾之序列	**MT1**	**MT4**	**倍數變化 MT1/MT4**
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 57)	EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.011%	0.004%	2.75
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 58)	QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.015%	0.001%	15.00
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 59)	TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.204%	0.026%	7.85
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 60)	DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.115%	0.018%	6.39
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 61)	TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.130%	0.020%	6.50

【0497】　**顏色及 2-側氧基-組胺酸之定量**。亦展示藉由蛋白酶消化所產生之寡肽中的 2-側氧基-組胺酸之百分比，如藉由質譜法所量測(**表 3-2**)。(將值針對未經修飾之肽進行歸一化。) 表 **3-2 (I)**展示針對以下所觀察到的氧化組胺酸/色胺酸之百分比：MT1 批次 1 之 AEX 流通液、MT1 批次 2 之 AEX 流通液及 MT1 批次 3 之 AEX 流通液。**表 3-2 (II)**展示針對以下所觀察到的氧化組胺酸/色胺酸之百分比：酸性級分 1、酸性級分 2 及針對 MT1 批次 3 進行 CEX 分離所獲得之主要級分。自此表中可清楚地看出，酸性變異體包含經氧化的種類。自**表 3-2(I)**中可明顯看出，構成肽/蛋白質之 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化之%與 AEX 汽提液相比在 AEX 流通液中係降低的。顯然，汽提 AEX 管柱可富集此等經修飾之肽之百分比。例如，經修飾之肽「EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)」之%在 AEX 流通液 (MT1 批次 1)中為 0.013%，而在「AEX 汽提液」中為 0.080%。由此亦證實 AEX 管柱捕獲經修飾之肽，從而降低 AEX 流通液中經修飾之肽之百分比。

表 3-2 (I). 2-側氧基-組胺酸/色胺酸之百分比

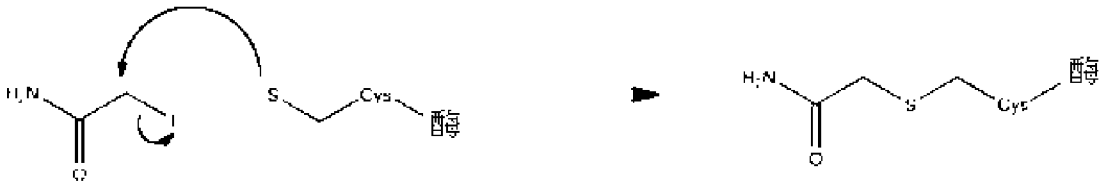
經修飾之肽	**AEX 汽提液**	**AEX 流通液**

	強烈的黃色	MT1 批次 1 BY1，110 mg/mL	MT1 批次 2 ≤BY3，110 mg/mL	MT1 批次 3 ≤BY3，110 mg/mL
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.080%	0.013%	0.008%	0.006%
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.054%	0.028%	0.023%	0.019%
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.235%	0.085%	0.049%	0.049%
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.544%	0.092%	0.077%	0.057%
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.089%	0.022%	0.011%	0.010%
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.738%	0.252%	0.198%	0.298%

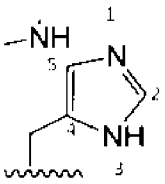
表 3-2 (II). 2-側氧基-組胺酸/色胺酸之百分比

經修飾之肽	CEX 流通液		
	來自 MT1 批次 3 之酸性級分 1 黃色	來自 MT1 批次 3 之酸性級分 2 黃色	來自 MT1 批次 3 之主要級分 無顏色
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.009%	0.008%	0.004%
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.013%	0.015%	0.006%
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.131%	0.151%	0.049%
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.117%	0.132%	0.068%
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.014%	0.008%	0.008%
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.458%	0.269%	0.185%

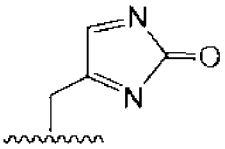
【0498】　在**表 3-2(II)**中，[+57]表示藉由碘乙醯胺使半胱胺酸烷化將在半胱胺酸上添加羧甲基胺部分，其淨質量與未經修飾之半胱胺酸相比增加了約+57：



【0499】　在**表 3-2(II)**中，[+14]表示由 His 轉化為 2-側氧基-His，一個氧原子添加至碳 2 上，但失去兩個氫原子(一個來自碳 2，另一個來自氮 3)，其淨質量與未經修飾之組胺酸相比增加了約+14。



His



2-側氧基-His

【0500】 在**表 3-2(II)**中，[+32]表示色胺酸二氧化導致形成 N-甲醯基犬尿胺酸，其淨質量與未經修飾之色胺酸相比增加了約+32 (**圖 4**)。

【0501】 進行第二組實驗以評估藉由 AEX 層析處理的經蛋白酶消化之 FabRICATOR 切割之阿柏西普(MT4)的寡肽中 2-側氧基-組胺酸(及色胺酸二氧化)之百分比(以下**圖 13** 及**表 3-3**)。在經蛋白酶消化之 FabRICATOR 切割之阿柏西普(MT4)的寡肽之 AEX 汽提液中 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化之百分比顯著高於 AEX 流通液中 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化之百分比(參看下**表 3-3** 中之「MT1」)。

表 3-3. 2-側氧基-組胺酸之百分比

經修飾之肽	全長阿柏西普	MT1	來自 MT1 之 AEX 汽提液	AEX 汽提液/MT1 之變化倍數
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.22%	0.34%	0.81%	2.4
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.00%	0.02%	0.08%	4.0
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.01%	0.04%	0.07%	1.8
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.01%	0.19%	0.42%	2.2
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.01%[a]	0.11%	0.63%	5.7
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.00%	0.03%	0.10%	3.3

[a]使用全長阿柏西普之不同肽計算的值，因為 C 端肽與 MiniTrap 不同。

【0502】 在 MT1 產生期間，AEX 汽提液中 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化之百分比顯著高於 AEX 流通液中 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化之百分比(參看上**表 3-3** 中之「MT1」)。與**表 3-2** 相比，**表 3-3** 展示相似的結果：汽提 AEX 管柱所產生之樣本中的 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化百分比顯著高於 AEX 流通液中 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化百分比，表明在分離期間 2-側氧基-組胺酸及色胺酸二氧化種類與 AEX 管柱結合，並在汽提 AEX 管柱後移除。這在提取離子層析圖中更明顯，如**圖 14** 中所見。

強陽離子交換層析(CEX)

【0503】 為了識別包含抗 VEGF 蛋白之樣本中存在的酸性種類及其他變異體，進行一系列實驗。

【0504】 使用 MonoS (10/100) GL 管柱(GE Life Sciences, Marlborough, MA)進行強陽離子交換層析。對於樣本分離，所用流動相為 20 mM 2-(N-嗎福啉代)乙磺酸(MES) pH 5.7 (流動相 A)及 40 mM 磷酸鈉、100 mM 氯化鈉 pH 9.0 (流動相 B)。將非線性 pH 梯度用於溶析 MT1 之電荷變異體，並在 280 nm 處偵測。在相對滯留時間早於主峰溶析之峰在本文中稱為酸性種類。

【0505】 在任何富集之前，來自 MT1 批次 2 (≤BY3)之樣本皆使用**圖 15** 中所示之方法進行 CEX。為了降低 MT1 變異體之複雜性，對樣本進行去唾液酸化處理。繼之進行製備型 SEC 處理(Superdex 200 製備級 XK26/100)，使用 1X DPBS pH 7.2±0.2 作為流動相。將得自包含去唾液酸化 MiniTrap (dsMT1)之製備型 SEC 管柱之級分合併，並進一步進行強陽離子交換(SCX)層析，以便使用雙重鹽-pH 梯度富集 MT1 之電荷變異體。程序產生總共 7 個級分(F1-F7；MC 表示方法對照，**圖 16** 及**圖 17**)。

【0506】 進行 CEX 時，酸性種類之溶析時間早於主峰，而鹼性種類之溶析時間晚於主峰。如**圖 17** 中所觀察，峰 3-5 為主峰。在溶析 MT1 之主要種類(峰 3-5)之前，溶析出峰 1 及 2，且因此包含酸性種類。在溶析 MT1 之主要種類(峰 3-5)之後，溶析出峰 6，且因此包含鹼性種類。**表 3-4** 展示在 MC 中的峰之相對豐度(如**圖 16** 中所識別)。例如，**表 3-4** 之第二列(標記為 MC)展示 MC 中酸性種類之總相對量為約 19.8% (亦即峰 1 + 峰 2)。**表 3-4** 亦展示每個單獨級分之峰之相對豐度。儘管在不同級分中有重疊種類(如**圖 16** 及**圖 17** 所反映)，但級分 F1 及 F2 之大部分為酸性種類(亦即峰 1 及峰 2)。例如，級分 F1 包含 63.7%峰 1 及 19.2%峰 2 (總共 82.9%之酸性種類)。級分 F2 包含 9.6%峰 1 及 75.9%峰 2 (總共 85.5%之酸性種類)。級分 F3-F5 之大部分為 MT1 之主要種類(峰 3-5)。最後，級分 F6-F7 之大部分為鹼性種類(峰 6)，但確實包括一些部分之主要種類(例如峰 4 及 5)。

【0507】 亦觀察到，級分 F1 及 F2 (包含酸性種類)與級分 F3-F5 (包含主要種類或「MT1」)相比具有強烈的黃棕色著色。在濃度≥13 mg/mL 下檢查所

有級分之顏色。自此實例中明顯看出，樣本中酸性種類之存在係以黃棕色著色之出現來追蹤，該著色之移除(或最小化)可藉由自 MT1 中移除(或最少化)酸性種類來完成。

表 3-4. 基於分析 CEX 的峰之相對豐度

樣本	峰面積(%)					
	峰 1	**峰 2**	**峰 3**	**峰 4**	**峰 5**	**峰 6**
MC	5.9	13.9	15.0	25.4	20.9	19.0
MT1 F1	63.7	19.2	17.1	ND	ND	ND
MT1 F2	9.6	75.9	10.6	2.2	1.6	ND
MT1 F3	ND	5.0	57.2	37.8	ND	ND
MT1 F4	ND	ND	16.3	56.3	27.4	ND
MT1 F5	ND	ND	ND	33.1	50.4	16.5
MT1 F6	ND	ND	ND	16.0	27.7	56.3
MT1 F7	2.8	7.7	8.0	16.1	16.5	48.9

ND：未偵測到

【0508】 MT1 批次 2 及級分 F1-F7 之 3D 層析圖示於**圖 18A-H** 中。MT1 批次 2 未呈現任何顯著的光譜特徵(**圖 18A**)。級分 1 及 2 (包含酸性種類)呈現介於 320-360 nm 之間的光譜特徵(參見**圖 18B** 中之圓圈)。與級分 2 相比，此特徵在級分 1 中更為突出(**圖 18B** 及**圖 18C**)，而在級分 3 及級分 4-7 (主要種類，MT1)中則不存在(**圖 18D** 及**圖 18H**)，此等級分未呈現黃棕色著色。

【0509】 因此，如上所觀察，CEX 實現酸性種類/酸性級分(級分 1 及 2)之識別，它們與主要種類/級分(級分 3-6)相比展示強烈的黃棕色著色。此結果亦以級分 F1-F2 之 3D 層析圖中存在而級分 F3-F7 中不存在的獨特光譜特徵之形式觀察到。

成像毛細管等電聚焦(icIEF)電泳圖

【0510】 藉由 icIEF 進一步評估級分 F1-7 及 MC (來自 CEX 後之 MT1-批次 2)中之變異體分佈(**圖 19**)。

【0511】 級分 F1-7 及 MC (來自 CEX 後之 MT1-批次 2)之變異體分佈係使用具有經碳氟化合物塗覆之毛細管筒(100 μm x 5 cm)的 iCE3 分析儀(ProteinSimple)藉由 icIEF 來進一步評估。兩性電解質溶液係由以下各物於純淨水中之混合物組成：0.35%甲基纖維素(MC)、0.75% Pharmalyte 3-10 載劑兩性電解質、4.2% Pharmalyte 8-10.5 載劑兩性電解質以及 0.2% pI 標記物 7.40 及 0.15% pI 標記物 9.77。陽極電解液為 80 mM 磷酸，而陰極電解液為 100 mM

氫氧化鈉，均在 0.10%甲基纖維素中。將樣本在純淨水中稀釋，並以 1:200 (每毫克 MT1 之唾液酸酶 A 之單位數)之酶與受質比率將唾液酸酶 A 添加至每個經稀釋之樣本中，繼之在環境溫度下培育大約 16 小時。將經唾液酸酶 A 處理之樣本與兩性電解質溶液混合，接著藉由引入 1500 V 之電位持續 1 分鐘，隨後引入 3000 V 之電位持續 7 分鐘來聚焦。經聚焦之 MT1 變異體之影像係藉由使 280 nm 紫外光通過毛細管並進入電荷耦合裝置數位相機之鏡頭中而獲得。接著分析此影像以確定各種電荷變異體之分佈。(**圖 19**)。參看**圖 19**，級分 F1 及 F2 (或酸性級分)展示不存在 MT1 之峰，該峰在 MC 及級分 F3-F7 (主要種類，MT1)中清楚地觀察到。因此，認為 icIEF 電泳圖能夠偵測及確定所考慮之蛋白質(在此情況下為 MT1)的不同電荷變異體之分佈。因此，很明顯，進行 CEX 分析時，酸性級分展示(a) 2-側氧基-組胺酸或二側氧基-色胺酸之相對豐度百分比之增加(**表 3-2 (II)**)；(b)黃棕色著色之增加(數據未顯示)；及(c)如級分 1 及 2 之 3D 層析圖中所見的光譜特徵之存在(**圖 18B** 及**圖 18C**)。

實例 4. 光誘導研究

【0512】　在此實例中，藉由使蛋白質樣本暴露於變化量之冷白(CW)螢光或紫外線 A (UVA)光來進行 VEGF MiniTrap (MT)(例如 MT1)之光誘導。測定光暴露之樣本之顏色及經氧化胺基酸含量。如上所述，在暴露後進行 LCMS 分析。MT 暴露於冷白光或 UVA 光將造成經氧化胺基酸殘基(例如組胺酸)之增加(**表 4-1**、**表 4-2** 及**表 4-3**)。

表 4-1. 光誘導研究設計

累積暴露	0.2 (xICH)	0.5 (x ICH)	0.8 (xICH)	1.0 (xICH)H	2.0 (xICH)
CW 螢光暴露(lux*hr)	24 萬 lux*hr	60 萬 lux*hr	96 萬 lux*hr	120 萬 lux*hr	240 萬 lux*hr
CW 螢光燈之培育時間 (8 klux)	30 小時	75 小時	100 小時	150 小時	300 小時
UVA 暴露($W*hr/m^2$)	40	100	160	200	400
在 UVA 下之培育時間 (10 W/m^2)	4 小時	10 小時	16 小時	20 小時	40 小時

ICH 係指 ICH 協調三方指南(ICH Harmonised Tripartite Guideline)：穩定性測試：新原料藥及產品 Q1B 之光穩定性測試(Photostability Testing of New Drug

Substances and Products Q1B)，其中規定在不小於 120 萬 lux*小時冷白螢光及近紫外線能量不小於 200 W*hr/m^2 下進行光穩定性研究。

【0513】 **表 4-2** 描述暴露於冷白光及紫外光的 MT 樣本之著色的增加。例如，樣本(t=0)之 b 值為 9.58。此樣本在暴露於 240 萬 lux*hr 下之冷白光時，b 值增至 22.14。b 值之此增加表明使 MT 暴露於 240 萬 lux*hr 下之冷白光與樣本(t=0)相比，增加樣本之黃棕色著色。類似地，在 MT 樣本(t=0)暴露於 400 W*h/m2 下之紫外光時，b 值自 9.58 增至 10.72。b 值之此增加表明使 MT 樣本暴露於 400 W*h/m2 下之紫外光與樣本(t=0)相比，增加樣本之黃棕色著色。

表 4-2. 暴露於冷白光及紫外光之樣本的顏色

光暴露 xICH (lux*hr)	L*	a*	b*	BY 值
冷白光				
T=0	97.37	-1.12	9.58	4.0
0.2x (24 萬 lux*hr)	96.46	-0.72	11.75	3.7
0.5x (60 萬 lux*hr)	95.47	-0.4	11.3	3.7
0.8x (96 萬 lux*hr)	95.33	-0.38	11.96	3.6
1.0x (120 萬 lux*hr)	94.42	-0.2	13.72	3.3
2.0x (240 萬 lux*hr)	92.70	0.41	22.14	2.0
UVA				
0.2x (40 W*h/m^2)	97.26	-0.92	12.66	3.5
0.5x (100 W*h/m^2)	100.39	-1.01	11.83	3.7
0.8x (160 W*h/m^2)	79.69	-0.18	10.1	3.6
1.0x (200 W*h/m^2)	97.48	-0.95	11.36	3.7
2.0x (400 W*h/m^2)	97.76	-0.98	10.72	3.8

樣本顏色係使用 CIELAB 顏色空間(L*, a*及 b*變量)並相對於 EP BY 顏色標準表示；L* = 白色至黑色(L*為明度)；a* = 洋紅色至淺綠色；b* = 黃色至藍色，b 值越高，黃色越強。

表 4-3 (I). 來自經紫外光應力處理之 MiniTrap 的肽中之 2-側氧基-His 水準

肽	位點	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	H209	0.056%	0.067%	0.081%	0.088%	0.077%	0.091%
EIGLLTCEATVNGH	H86	0.010%	0.020%	0.034%	0.037%	0.033%	0.035%

肽	位點	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
LYK (SEQ ID NO.: 18)							
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	H110	0.024%	0.031%	0.028%	0.028%	0.027%	0.027%
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 20)	H145	0.096%	0.147%	0.163%	0.173%	0.147%	0.125%
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 21)	H95	0.014%	0.032%	0.044%	0.056%	0.058%	0.078%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)	H19	0.007%	0.013%	0.021%	0.025%	0.024%	0.034%
VHEKDK (SEQ ID NO.: 23)	H203	0.040%	0.105%	0.238%	0.255%	0.269%	0.324%

表 4-3 (II). 來自經冷白光應力處理之 MiniTrap 的肽中之 2-側氧基-His 水準

肽	位點	t0	CW_30h	CW_75h	CW_100h	CW_150h	CW_300h
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	H209	0.056%	0.152%	0.220%	0.243%	0.258%	0.399%
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 18)	H86	0.010%	0.063%	0.110%	0.132%	0.170%	0.308%
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	H110	0.024%	0.085%	0.120%	0.128%	0.148%	0.180%
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 20)	H145	0.096%	0.423%	0.585%	0.634%	0.697%	0.748%
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 21)	H95	0.014%	0.103%	0.175%	0.198%	0.267%	0.437%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)	H19	0.007%	0.025%	0.043%	0.049%	0.058%	0.115%
VHEKDK (SEQ ID NO.: 23)	H203	0.040%	0.426%	0.542%	0.622%	0.702%	1.309%

【0514】 阿柏西普 MT 於冷白光或 UVA 光之暴露係以經氧化組胺酸(2-側氧基-his)之出現來追蹤(**表 4-3**)。參看**表 4-3**，在 MT 樣本(t=0)中具有側氧基-組胺酸之肽「SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)」為 0.007%, 而在紫外光下暴露 40 小時，其豐度增至 0.324% (**表 4-3(I)**)，而在冷白光下暴露 300 小時，其豐度增至 1.309% (**表 4-3(II)**)。

【0515】 觀察到 2-側氧基-組胺酸之兩種種類，亦即 13.98 Da 種類(如**圖 2** 所示)及 15.99 Da 種類(如**圖 3** 所示)，其中 13.98 Da 種類在經光應力處理之

MiniTrap 樣本中佔優勢。已知 15.99 Da 種類為銅金屬催化過程之產物。Schöneich, J. Pharm. Biomed Anal. 21:1093-1097 (2000)。此外，13.98 Da 種類為光驅動過程之產物。Liu 等人, Anal. Chem. 86(10: 4940-4948 (2014))。

【0516】 類似於暴露於冷白光及 UVA 光之樣本中的經氧化組胺酸之豐度增加，使 MT 暴露於冷白光或 UVA 光亦誘導其他 PTM 之形成(**表 4-4** 及**表 4-5**)。

表 4-4 (I). 在來自經紫外光應力處理之 MiniTrap 的肽中之其他 PTM

肽	位點	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
脫醯胺							
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 62)	N84	20.8 %	21.7 %	21.5 %	21.5 %	22.7%	22.4%
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 63)	N99	5.3%	5.4%	5.5%	5.4%	5.5%	5.6%
氧化							
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)	M10	4.5%	8.2%	11.1%	13.3 %	13.8%	19.3%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 65)	M20	1.1%	2.0%	2.8%	3.4%	3.4%	4.6%
TQSGSEMK (SEQ ID NO.: 66)	M163	2.0%	2.7%	4.1%	4.6%	7.9%	8.7%
SDQGLYTCAASSGLMTK (SEQ ID NO.: 67)	M192	5.4%	8.1%	10.9 %	12.1 %	12.5%	18.3%
3-去氧葡醛酮糖							
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 68)	R5	9.9%	10.0 %	9.9%	9.7%	9.8%	9.3%

表 4-4 (II). 來自經冷白光應力處理之 MiniTrap 的肽中之其他 PTM

肽	位點	t0	CW_30h	CW_75h	CW_100h	CW_150h	CW_300h
脫醯胺							
EIGLLT**C**EATV**N**GHLYK (SEQ ID NO.: 62)	N84	20.8%	22.0%	22.9%	20.3%	21.8%	21.3%
QT**N**TIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 63)	N99	5.3%	5.6%	5.2%	5.6%	5.5%	5.8%
氧化							
SDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)	M10	4.5%	11.7%	17.3%	19.9%	25.1%	39.7%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 65)	M20	1.1%	3.1%	4.3%	5.1%	6.1%	8.2%
TQSGSE**M**K (SEQ ID NO.: 66)	M163	2.0%	3.3%	15.7%	11.7%	26.4%	20.5%
SDQGLYT**C**AASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	M192	5.4%	10.7%	15.3%	18.7%	22.8%	37.6%
3-去氧葡醛酮糖							

肽	位點	t0	CW_30h	CW_75h	CW_100h	CW_150h	CW_300h
SDTG**R**PFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 68)	R5	9.9%	9.9%	9.6%	9.3%	9.3%	9.0%

表 4-5 (I). 來自經紫外光應力處理之 MiniTrap 的肽中之色胺酸/酪胺酸/苯丙胺酸之氧化水準

肽	修飾	位點	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
SDQGLYTCAASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	+4	W58	0.016%	0.049%	0.089%	0.119%	0.132%	0.221%
	+16		0.047%	0.109%	0.177%	0.225%	0.242%	0.514%
	+32		0.200%	0.487%	0.415%	0.481%	0.423%	0.498%
	+48		0.000%	0.000%	0.000%	0.001%	0.001%	0.001%
TELNVGIDFN**W**EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)	+4	W138	0.435%	0.462%	0.550%	0.557%	0.502%	0.512%
	+16		0.083%	0.100%	0.161%	0.206%	0.239%	0.448%
	+32		0.009%	0.018%	0.027%	0.039%	0.044%	0.115%
	+48		0.284%	0.278%	0.270%	0.302%	0.343%	0.275%
GFIISNAT**Y**K (SEQ ID NO.: 69)	+16	Y64	0.032%	0.041%	0.046%	0.053%	0.054%	0.073%
K**F**PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)	+16	F44	0.068%	0.077%	0.087%	0.084%	0.070%	0.096%
FLSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 71)	+16	F166	0.066%	0.075%	0.085%	0.089%	0.089%	0.124%

表 4-5 (II). 來自經冷白光應力處理之 MiniTrap 的肽中之色胺酸/酪胺酸/苯丙胺酸之氧化水準

肽	修飾	位點	t0	CW_30h	CW_75h	CW_100h	CW_150h	CW_300h
SDQGLYTCAASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	+4	W58	0.016%	0.063%	0.124%	0.161%	0.228%	0.526%
	+16		0.047%	0.129%	0.227%	0.283%	0.377%	0.795%
	+32		0.200%	1.601%	2.706%	3.139%	3.925%	6.974%
	+48		0.000%	0.001%	0.002%	0.002%	0.003%	0.005%
TELNVGIDFN**W**EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)	+4	W138	0.435%	0.555%	0.481%	0.490%	0.429%	0.522%
	+16		0.083	0.109%	0.364%	0.251%	0.399	0.753%

肽	修飾	位點	t0	CW_30 h	CW_75 h	CW_100 h	CW_ 150h	CW_30 0h
			%				%	
	+32		0.009 %	0.019%	0.027%	0.033%	0.048 %	0.135%
	+48		0.284 %	0.284%	0.330%	0.308%	0.347 %	0.316%
GFIISNATYK (SEQ ID NO.: 69)	+16	Y64	0.032 %	0.043%	0.057%	0.063%	0.078 %	0.127%
KFPLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)	+16	F44	0.068 %	0.087%	0.072%	0.088%	0.079 %	0.144%
FLSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 71)	+16	F166	0.066 %	0.091%	0.088%	0.101%	0.112 %	0.168%

【0517】　因此，MT 於冷白光或 UVA 光之暴露係以經氧化殘基(諸如組胺酸/色胺酸(側氧基-Trp))之出現來追蹤。觀察到側氧基-trp 之四種種類：+4 Da、+16 Da、+32 Da 及+48 Da。+4 Da 種類係由犬尿胺酸之形成來解釋(**圖 4**)，而 16 Da、+32 Da 及+48 Da 為色胺酸殘基之單氧化、二氧化及三氧化。在 320 nm 處監測的 MT 樣本之胰蛋白酶消化物之肽作圖如**圖 20** 中所示。可在**圖 20** 中比較構成肽的經氧化殘基之相對存在。例如，對於肽 IIW(+4)DSRK 而言，可看出在 MT 樣本 t=0、及暴露於 UVA 40 小時之 MT 樣本及暴露於 CWL 300 小時之 MT1 樣本中，其存在具有顯著差異。

【0518】　亦評估 MT 在暴露於冷白光或 UVA 光下，HMW/低分子量(LMW)種類之存在(**表 4-6**)。

表 4-6. 在延長的 UVA 及 CWL 應力處理之後產生 HMW/LMW 種類

樣本：MT1，80 mg/mL，pH 5.8						
	光暴露之樣本	深色對照樣本	光暴露之樣本	深色對照樣本	光暴露之樣本	深色對照樣本
累積 UVA 暴露(x ICH)						
	HMW%		天然%		LMW%	
t=0	2.1	NA	96.7	NA	1.2	NA
0.2x ICH (40 W*h/m2)	2.1	2.1	96.7	96.7	1.2	1.3
0.5x ICH (100 W*h/m2)	11.6	2.2	86.5	96.6	1.9	1.2
0.8x ICH (160 W*h/m2)	14.5	2.2	83.4	96.6	2.1	1.2
1.0x ICH (200 W*h/m2)	15.8	2.2	81.9	96.6	2.3	1.3
2.0x ICH (400 W*h/m2)	22.7	2.3	74.5	96.7	2.8	1.0

累積 CWL 暴露(x ICH)						
	HMW%		天然%		LMW%	
0.2x ICH (24 萬 lux* h)	12.1	2.2	86.6	96.6	1.4	1.2
0.5x ICH (60 萬 lux*hr)	20.4	2.3	77.9	96.4	1.6	1.3
0.8x ICH (96 萬 lux*hr)	23.2	2.4	75.1	96.2	1.7	1.4
1.0x ICH (120 萬 lux*hr)	30.1	2.6	68.1	96.2	1.9	1.3
2.0x ICH (240 萬 lux*hr)	45.0	2.9	52.6	95.8	2.4	1.4

【0519】 為了追蹤關於每個樣本之 HMW/LMW 種類之著色，如上所示對所有應力處理之樣本(CWL 及 UVA)執行具有全譜 PDA 偵測之分析型尺寸排阻層析(SEC-PDA)。SEC-PDA 對經 CWL 應力處理之 MT 的分析揭示，除了 LMW 種類外的所有尺寸變異體在~350 nm 處之吸光度的顯著增加(**圖 21**)，而對經 UVA 應力處理之 MT 的 SEC-PDA 則未顯示出在~350 nm 處之吸光度增加(**圖 22**)。與 CWL 應力處理之樣本不同，經 UVA 應力處理之樣本不產生任何顯著可量化之黃棕色。

【0520】 在研究經 UVA 及 CWL 應力處理之樣本在 320 nm 與 280 nm 處的吸光度比之後，獲得相似的結果。藉由原始強度或總峰面積分析之 A320/A280 比率在經 CWL 應力處理之樣本中以黃色強度之增加來追蹤(**圖 23**)，而 A320/A280 比率在經 UVA 應力處理之樣本中不以黃色強度之增加來追蹤(**圖 24**)。這證實了先前之觀察結果，即經 UVA 應力處理之 MT1 樣本在 CWL 應力處理後觀察不到相同的黃棕色。

實例 5. 減少著色之上游方法

5.1 化學成分確定之培養基的培育研究

【0521】 考察摻入包含阿柏西普之新鮮的化學成分確定之培養基(CDM)中的各種成分對於著色之影響。

【0522】 將一或多個具有 10 mL 工作體積(新鮮 CDM1)之 50 mL 加透氣蓋(vent-capped)之振盪管培育 7 天，分別在第 0 天及第 7 天取樣。將阿柏西普樣本(在緩衝水溶液 pH 6.2 中之阿柏西普重組蛋白，該緩衝水溶液包含 5 mM 磷酸鈉、5 mM 檸檬酸鈉及 100 mM 氯化鈉)以 6 g/L 之濃度摻入振盪管中。

【0523】　添加組分以達到累積濃度：

- 半胱胺酸：16.6 mM
- 鐵：0.23 mM
- 銅：0.0071 mM
- 鋅：0.54 mM

【0524】　所添加之每種成分對 b*值(CIE L*, a*, b*顏色空間)之按比例效應在**圖 25A** 中列出，並且實際 b*值針對預測 b*值之繪圖在**圖 25B** 中列出。半胱胺酸之添加導致最大的黃棕色增加。鐵及鋅亦產生顏色。葉酸及 B 族維生素(包括硫胺素、菸鹼醯胺、D-泛酸、D-生物素及吡哆醇)增加黃棕色。核黃素及維生素 B12 在統計學上沒有影響顏色。

5.2 減少半胱胺酸及金屬對 b*值之影響

【0525】　由產阿柏西普之細胞株的種菌培養物接種生物反應器(例如 2 L)。使經接種之培養物在 35.5 ℃ 之溫度、pH 7.1±0.25 及 22 ccm 之空氣噴射設定點下生長。根據需要向生物反應器中補充葡萄糖、消泡劑及基礎進料。在 CDM1 中評估表現阿柏西普時降低半胱胺酸及金屬之濃度對顏色之影響。第 0 天之培養基 = CDM1，包括 1.48 mM 之半胱胺酸

- 營養進料：
  - 第 2 天 = 化學成分確定之進料(CDF) + 1.3-2.1 mM 半胱胺酸
  - 第 4 天 = CDF + 1.6-1.7 mM 半胱胺酸
  - 第 6 天 = CDF + 1.6-1.7 mM 半胱胺酸
  - 第 8 天 = CDF + 1.6-1.7 mM 半胱胺酸

【0526】　生物反應器之條件如下：

- 以每升培養物約 6-7 毫莫耳、每升培養物 8-9 毫莫耳或每升培養物 10-11 毫莫耳之累積濃度添加半胱胺酸。
- 下面列出 CDM1 (0.5x、1x 或 1.5x CDM1 水準)中 1x 水準之金屬(其中濃度為接種物添加之前的濃度)：
  - Fe = 每升培養物 68-83 微莫耳
  - Zn = 每升培養物 6-7 微莫耳
  - Cu = 每升培養物 0.1-0.2 微莫耳

○ Ni = 每升培養物 0.5-1 微莫耳

累積半胱胺酸水準降至 6-7 毫莫耳/L 會減少黃棕色，其中對力價無明顯影響。培養基中之金屬濃度降至 0.5x 會減少顏色，其中力價有顯著提高。對力價、VCC (活細胞濃度)、生存力、氨或重量滲透濃度之影響最小(參見**圖 26A-E**)。金屬含量及半胱胺酸對 b*值及力價之預測的按比例效應在**圖 27** 中列出。

5.3 抗氧化劑對 b*值之影響的評價

【0527】 評估摻入包含阿柏西普之廢 CDM 中的抗氧化劑、牛磺酸、次牛磺酸、硫辛酸、麩胱甘肽、甘胺酸及維生素 C 對顏色之影響。將一或多個具有 10 mL 工作體積(CDM1)之 50 mL 加透氣蓋之振盪管培育 7 天，在第 0 天及第 7 天取樣。

【0528】 向廢 CDM1 中添加組分之條件如下：

- 阿柏西普樣本(在緩衝水溶液 pH 6.2 中之阿柏西普重組蛋白，其包含 5 mM 磷酸鈉、5 mM 檸檬酸鈉及 100 mM 氯化鈉)以 6 g/L 之濃度摻入振盪管中
- 以下列濃度添加至廢 CDM1 中的抗氧化劑：

○ 牛磺酸 = 10 mM 之培養物

○ 次牛磺酸= 10 mM 之培養物

○ 甘胺酸 = 10 mM 之培養物

○ 硫辛酸 = 0.0024 mM 之培養物

○ 還原麩胱甘肽 = 2 mM 之培養物

○ 氫皮質酮 = 0.0014 mM 之培養物

○ 維生素 C(抗壞血酸) = 0.028 mM 之培養物

【0529】 多重抗氧化劑減少廢培養基中之顏色形成：次牛磺酸、牛磺酸及甘胺酸之組合；硫辛酸；以及維生素 C。麩胱甘肽增加 b*值。

表 5-1. 抗氧化劑對 MiniTrap 之顏色形成之影響的概述

條件	b*值
第 0 天之廢培養基	0.37
第 7 天之廢培養基對照	1.47
第 7 天之廢培養基 + 抗氧化劑 *	1.02

*顯著減小 b*值之抗氧化劑：次牛磺酸/牛磺酸/甘胺酸、硫辛酸、維生素 C。

【0530】 各種抗氧化劑對 b*值(CIE L*, a*, b*顏色空間)之預測效應的概述在 **圖 28 (A-C)**中列出。

【0531】 評估摻入包含阿柏西普之廢 CDM 中的抗氧化劑之進一步添加對顏色之影響。將一或多個具有 10 mL 工作體積(CDM1)之 50 mL 加透氣蓋之振盪管培育 7 天，在第 0 天及第 7 天取樣。

【0532】 向廢 CDM1 中添加組分之條件如下：

- 阿柏西普樣本(在緩衝水溶液 pH 6.2 中之阿柏西普重組蛋白，該緩衝水溶液包含 5 mM 磷酸鈉、5 mM 檸檬酸鈉及 100 mM 氯化鈉)以 6 g/L 之濃度摻入振盪管中
- 運行兩個 DOE 實驗：
- (i) 抗氧化劑以下列濃度添加至廢 CDM1 中：
  - 牛磺酸 = 10 mM 之培養物
  - 次牛磺酸= 10 mM 之培養物
  - 甘胺酸 = 10 mM 之培養物
  - 硫辛酸= 0.0024 mM 之培養物
  - 維生素 C (抗壞血酸) = 0.028 mM 之培養物
- (ii) 添加抗氧化劑以達到以下累積濃度：
  - ATA = 2.5 μM – 5 μM
  - 甲磺酸去鐵胺(DFO) = 5 μM – 10 μM
  - 過氧化氫酶= 101.5 mg/L
  - S-羧甲基-L-半胱胺酸 = 10 mM

【0533】 發現次牛磺酸減少廢培養基中之顏色形成(**圖 28D**)。DFO 亦顯著減少廢培養基中之顏色形成(**圖 28D**)。其他抗氧化劑對顏色形成沒有統計學上之影響。

表 5-2. 抗氧化劑對 MiniTrap 之顏色形成之影響的概述

條件	b*值
第 0 天之廢培養基	0.44
第 7 天之廢培養基對照	1.73

第 7 天之廢培養基 +次牛磺酸	1.32
第 7 天之廢培養基 + DFO	0.92

振盪瓶抗氧化劑研究：

【0534】 對牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸、硫辛酸及維生素 C 關於減少細胞培養物中顏色形成之能力進行單獨及組合評估(**表 5-3**)。

【0535】 由產阿柏西普之細胞株的種菌培養物接種 250 mL 振盪瓶。使經接種之細胞在 35.5℃下在 5% CO_2 控制下之培育箱中生長。根據需要向振盪瓶中補充葡萄糖及基礎進料。使用上述製程，其中金屬在 CDM1 中以 0.5x 濃度存在，且半胱胺酸以 6-7 mM 之累積濃度添加。

表 5-3.

抗氧化劑	**水準 1 0x**	**水準 1 0.5x**	**水準 1 1x**
牛磺酸	0	3.75 mM	7.5 mM
次牛磺酸	0	3.75 mM	7.5 mM
甘胺酸	2.0 mM	5.75 mM	9.5 mM
硫辛酸	1.0 µm	1.9 µm	2.8 µm
維生素 C	0	11.0 µm	21.0 µm

【0536】 **圖 28E** 展示**表 5-3** 之抗氧化劑對 b*值(CIE L*, a*, b*顏色空間)及最終力價之預測效應。牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸顯著減小 b*值，而不會對力價產生負面影響。

實例 6. 使用 CDM 產生阿柏西普之醣化及生存力研究

【0537】 由產阿柏西普之細胞株的種菌培養物接種生物反應器(例如 2 L)。使經接種之培養物在 35.5℃ 之溫度、pH 7.1±0.25 及 22 ccm 之空氣噴射設定點下生長。根據需要向生物反應器中補充葡萄糖、消泡劑及基礎進料。阿柏西普蛋白之產生係使用 CDM1 (專屬)進行。表現阿柏西普融合蛋白之宿主細胞株之產生係使用 CDM 1 (專屬)、CDM 2 (商購獲得)及 CDM 3 (商購獲得)進行。使用 CDM 1、2 及 3 進行一組實驗，其中沒有額外的培養基組分。使用 CDM 1-3 (將錳(四水合氯化錳，Sigma，3.2 mg/L)、半乳糖(Sigma，8 g/L)及尿苷(Sigma，6 g/L)添加至進料中以修飾半乳醣化譜)進行另一組實驗。最後，使用 CDM 1-3 (將錳(四水合氯化錳，Sigma，3.2 mg/L)、半乳糖(Sigma，

8 g/L)及尿苷(Sigma，6 g/L)添加至進料中以修飾半乳醣化譜，並將地塞米松(Sigma，12 mg/L)添加至進料中以修飾組合物之唾液酸化譜)進行一組實驗。藉由離心，繼之 0.45 μm 過濾，即可製備出使用每種 CDM 之經澄清之收穫物。

【0538】 在 N-聚醣分析之前，用蛋白 A 處理樣本。

力價量測

【0539】 在整個此等實例中，除非另有說明，否則每天使用 Agilent (Santa Clara, CA) 1200 系列 HPLC 或等效物量測阿柏西普力價，其中在低 pH 值及逐步溶析梯度下操作，在 280 nm 處偵測。相對於參考標準校準曲線指定濃度。

活細胞密度(VCD)及細胞生存力值

【0540】 在整個此等實例中，除非另有說明，否則藉由 Nova BioProfile Flex 自動細胞計數器(Nova Biomedical，Waltham，MA)經由台盼藍排除法量測活細胞密度(VCD)及細胞生存力值。葡萄糖、乳酸鹽、離線 pH 值、溶解氧(DO)、pCO2 量測值及重量滲透濃度係用 Nova BioProfile Flex (Nova Biomedical, Waltham, MA)量測。

N-聚醣寡醣譜分析

【0541】 根據 Waters GlycoWorks 方案，使用 GlycoWorks 快速去醣化及 GlycoWorks RapiFluor-MS Label 套組(分別為 Waters 零件號 186008939 及 186008091)，製備大約 15 μg 來自 CDM 1-3 收穫物之經蛋白 A 處理之樣本以用於 N-聚醣分析。藉由在 50.5℃下用 PNGase-F 處理樣本 5 分鐘，接著在 25℃下冷卻 5 分鐘，自阿柏西普蛋白中移除 N-聚醣。經由在室溫下反應 5 分鐘，用 RapiFluor-MS 螢光染料標記釋放的聚醣。藉由向反應混合物中添加乙腈使蛋白質沉澱，並藉由在 2,204 xg 下離心 10 分鐘沉澱至孔底。收集包含經標記之聚醣的上清液，並在 UPLC 上使用具有管柱後螢光偵測之親水相互作用液相層析(Waters BEH Amide 管柱)進行分析。在結合至管柱後，分離經標記之聚醣，並使用由乙腈及 50 mM 甲酸銨水溶液(pH 4.4)構成之二元流動相梯度來溶析。使用螢光偵測器偵測經標記之聚醣，該螢光偵測器之激發波長為 265 nm，發射波長為 425 nm。使用所得層析圖中 N-聚醣峰之相對面

積百分比，將 N-聚醣分佈報告為符合以下條件之 N-聚醣之總百分比：(1)含有核心岩藻醣殘基(總岩藻醣化，**表 6-1**)，(2)含有至少一個唾液酸殘基(總唾液酸化，**表 6-2**)，(3)識別為甘露糖-5 (甘露糖-5，**表 6-3**)，(4)含有至少一個半乳糖殘基(總半乳醣化，**表 6-4**)及(5)具有已知身份(總識別峰，**表 6-5**)。

結果

【0542】 對於 CDM 1-3 (有或無額外組分)，活細胞計數(VCC)、生存力及收穫物力價之結果示於**圖 29-31** 中。

【0543】 在這九種培養物中，包含尿苷、錳及半乳糖之 CDM1 培養物在 12 天時展示最高力價(5.5 g/L)。無額外組分之 CDM1 在 12 天時與其他七種培養物相比亦展示高力價(約 4.25 g/L)(**圖 29**)。

【0544】 直至處理第 6 天，在各種條件下之細胞生存力結果均相似。在處理第 7 天後，有或無額外培養基組分之 CDM2 及 CDM3 培養物均展示大於約 90%生存力(**圖 30**)。

【0545】 具有尿苷、錳及半乳糖之 CDM1 培養物在第 6 天左右展示最高 VCC (**圖 31**)。

【0546】 培養物及補充劑對總體 N-聚醣分佈有重要影響(**表 6-1** 至 **6-5**)。使用由大豆水解物製成之經蛋白 A 處理之阿柏西普(評估兩個樣本)比較聚醣水準。**表 6-5** 中列出總識別峰。

表 6-1. 總岩藻醣化(%)

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天
CDM1	48.75	-	46.26
CDM1 +UMG	49.21	-	44.38
CDM1 + UMG + Dex	48.88	-	46.23
CDM2	-	45.68	45.14
CDM2 +UMG	-	46.36	45.27
CDM2 + UMG + Dex	-	46.92	-
CDM3	49.24	-	45.59
CDM3 +UMG	48.71	-	42.61
CDM3 + UMG + Dex	49.36	-	44.56
大豆水解物 1	51.37		
大豆水解物 2	52.43		

U 為尿苷，M 為錳，G 為半乳糖，Dex 為地塞米松

表 6-2. 總唾液酸化(%)

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天
CDM1	44.06	-	39.14
CDM1 +UMG	43.72	-	35.8
CDM1 + UMG + Dex	43.2	-	36.72
CDM2	-	37.62	36.67
CDM2 +UMG	-	37.57	36.29
CDM2 + UMG + Dex	-	38.06	-
CDM3	44	-	31.21
CDM3 +UMG	42.48	-	30.84
CDM3 + UMG + Dex	43.82	-	32.74
大豆水解物 1	58.24		
大豆水解物 2	59.23		

U 為尿苷，M 為錳，G 為半乳糖，Dex 為地塞米松

表 6-3. 甘露糖-5 (%)

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天
CDM1	6.76	-	10.1
CDM1 +UMG	6.9	-	13.17
CDM1 + UMG + Dex	6.23	-	8.86
CDM2	-	9.71	11.96
CDM2 +UMG	-	9.44	10.93
CDM2 + UMG + Dex	-	8.21	-
CDM3	2.31	-	12.63
CDM3 +UMG	2.71	-	13.38
CDM3 + UMG + Dex	2.05	-	11.98
大豆水解物 1	5.19		
大豆水解物 2	5.24		

U 為尿苷，M 為錳，G 為半乳糖，Dex 為地塞米松

表 6-4. 總半乳醣化(%)

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天
CDM1	68.44	-	62.9
CDM1 +UMG	69.25	-	59.02
CDM1 + UMG + Dex	69.05	-	63.26
CDM2	-	65.33	63.68
CDM2 +UMG	-	68.13	66
CDM2 + UMG + Dex	-	69.35	-
CDM3	74.57	-	62.28
CDM3 +UMG	74.82	-	62.2
CDM3 + UMG + Dex	76.48	-	65.18
大豆水解物 1	79.64		
大豆水解物 2	80.55		

U 為尿苷，M 為錳，G 為半乳糖，Dex 為地塞米松

表 6-5. 總識別峰(%)

條件	第 6 天	第 10 天	第 12 天
CDM1	87.28	-	84.67

CDM1 +UMG	88.43	-	83.82
CDM1 + UMG + Dex	87.36	-	83.44
CDM2	-	86.23	86.67
CDM2 +UMG	-	87.81	86.87
CDM2 + UMG + Dex	-	87.53	-
CDM3	86.38	-	86.31
CDM3 +UMG	87.07	-	86.13
CDM3 + UMG + Dex	87.18	-	87.43
大豆水解物 1	93.93		
大豆水解物 2	94.74		

U 為尿苷，M 為錳，G 為半乳糖，Dex 為地塞米松

【0547】 在各種 CDM 之培養物中，在第 12 天觀察到的總岩藻醣化、總唾液酸化、總半乳醣化及甘露糖-5 分別為 42.61%至 46.26%、30.84%至 39.14%、59.02 至 66%及 8.86%至 13.38%。此等醣化值不同於使用大豆水解物獲得之醣化值。

【0548】 最後，對經澄清之收穫物進行顏色量測，此等收穫物係由在補充有尿苷、錳及半乳糖之 CDM1、CDM2 及 CDM3 中表現阿柏西普之細胞獲得。生物反應器研究步驟之操作參數將為熟習此項技術之普通技術人員所知。

實例 7. 抗 VEGF 蛋白之親和力產生

7.1 VEGF MiniTrap 之表現

【0549】 將重組 VEGF MiniTrap (例如，MT5，SEQ ID NO.: 46)之編碼區與信號序列可操作地連接，選殖至哺乳動物表現載體中，並轉染至中國倉鼠卵巢(CHO-K1)細胞中；在用 400 μg/mL 潮黴素選擇 12 天之後分離經穩定轉染之池。將在化學成分確定的不含蛋白質之培養基中生長的穩定 CHO 細胞池用於產生蛋白質以進行測試。重組多肽自細胞分泌至生長培養基中。

【0550】 VEGF MiniTrap 之組成域序列

- 人類 Flt1 (登錄號 NP_001153392.1)
- 人類 Flk1 (登錄號 NP_002244.1)
- 人類 Fc (IGHG1，登錄號 P01857-1)

【0551】 自此製程獲得具有(MT5)之重組 VEGF MiniTrap，並進一步處理。

7.2 親和力層析管柱之製備

【0552】 評價能夠與 VEGF MiniTrap (MT5)結合之五種不同蛋白質。所用蛋白質包括 $VEGF_{165}$ (SEQ ID NO.: 72)、mAb1 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 73 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 74 為輕鏈)；mAb2 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 人類 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 75 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 76 為輕鏈)；mAb3 (小鼠抗 VEGF-R1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 77 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 78 為輕鏈)及 mAb4 (小鼠抗 VEGFR1 mAb 小鼠 IgG1，其中 SEQ ID NO.: 79 為重鏈，而 SEQ ID NO.: 80 為輕鏈)。

【0553】 藉由用 6 個管柱體積(CV)之 1 mM 冰冷的鹽酸以不超過 1 mL/min 之流率洗滌管柱來激活管柱。將 10 mg 每種蛋白質加載至三個 HiTrap NHS 激活之 HP 親和力管柱(1 mL，GE Healthcare, 目錄號 17-0716-01)上，並封閉管柱以允許偶合在室溫下進行 30 分鐘。用 18 個管柱體積之 0.5 M 乙酸鈉、0.5 M NaCl pH 4.0 洗滌管柱，並用 18 個管柱體積之 0.5 M Tris-HCl、0.5 M NaCl pH 8.3 封閉開放位點(按以下順序進行洗滌：6 個管柱體積之 0.5 M Tris-HCl、0.5 M NaCl pH 8.3；6 個管柱體積之 0.5 M 乙酸鈉(乙酸鈉：JT Baker, 目錄號 3470-01)、0.5 M NaCl pH 4.0；6 個管柱體積之 0.5 M Tris pH 8.3；在室溫下培育管柱 30 分鐘；6 個管柱體積之 0.5 M 乙酸鈉緩衝液、0.5 M NaCl pH 4.0；6 個管柱體積之 0.5 M Tris-HCl、0.5 NaCl pH 8.3；以及 6 個管柱體積之 0.5 M 乙酸鈉緩衝液、0.5 M NaCl pH 4.0)。將管柱儲存在 DPBS pH 7.5 中。所評估之五個管柱分別指定為管柱 1 (包含 $VEGF_{165}$)、管柱 2 (包含 mAb1)、管柱 3 (包含 mAb2)、管柱 4 (包含 mAb3)及管柱 5 (包含 mAb4)。

7.3 使用親和力層析產生 MiniTrap

【0554】 **樣本製備**。對 MiniTrap 執行兩種不同產生製程。在一種情況下，使用每個親和力管柱產生包含 MiniTrap 樣本之材料，其中將母體材料(MiniTrap)在 1X DPBS 緩衝液中稀釋至 20 mg/mL 並將其施加於管柱上，並在室溫下培育 30 分鐘。使用親和力管柱，自~7000 ppm 之 HCP 中分離 MiniTrap。

【0555】 替代地，使用在上清液中包含 0.4 mg/mL 蛋白質之收穫的培養物上清液，並且單獨加載至不同親和力管柱(1-5)上。不再進行稀釋。接著將親

和力管柱用 9 CV 之 1x DPBS 緩衝液洗滌，繼之用 IgG 溶析緩衝液 pH 2.8 (Thermo，目錄號 21009)溶析。

【0556】 隨後，將如上所述獲得的 MiniTrap 材料經由 0.45 μm 過濾器過濾或離心，之後加載至如以上部分 7.2 中所述製備之管柱上。將 25 mL 包含約 0.4 mg/mL 蛋白質之加載溶液加載至每個管柱上並且培育 20 分鐘。用 9 CV 之 DPBS (Invitrogen，目錄號 14190-144)洗滌每個管柱，之後溶析以進行平衡。洗滌級分中的 MT5 之量示於**表 7-1** 中。洗滌後使用 6 CV 之 pH 2.8 (商用溶析緩衝液(Thermo，目錄號 21009))及 100 mM 甘胺酸緩衝液 pH 2.5 來溶析，並藉由添加 1 M Tris pH 7.5 (Invitrogen 目錄號 15567-027)迅速中和各級分。溶析級分中的 MiniTrap 之量亦示於**表 7-1** 中。

【0557】 自所有五個親和力管柱成功產生 MiniTrap (MT5)。與 mAb1 及 mAb2 管柱相比，使用 $VEGF_{165}$ 之管柱的產率更高。包含人類化抗 VEGFR1 mAb 之 mAb3 及 mAb4 亦展示 MT5 之成功產生，其產率與 mAb1 及 mAb2 相似。在**表 7-1** 中，基於 100%偶聯效率及親和力捕獲蛋白與 MT5 之 1:1 莫耳比來計算預期產率。

表 7-1.

親和力管柱	**管柱 1 $VEGF_{165}$**	**管柱 2 mAb1**	**管柱 3 mAb2**	**管柱 4 mAb3**	**管柱 5 mAb4**
偶聯量(mg)	10	10	10	10	10
加載液(mg)	21.2	21.2	21.2	20.1	20.1
預期(mg)	~12	~3.2	~3.2	~3.2	~3.2
洗滌液(mg)	14.9	13.2	12.6	15.2	14.7
析出液(mg)	4.8	1.6	1.8	1.5	1.6

7.4 管柱穩定性研究

【0558】 按照部分 7.3 中論述之方法，使用管柱 1 及 2 進行多次運行(針對管柱 1 之**表 7-2** 及針對管柱 2 之**表 7-3**)。

表 7-2

生產產率							
運行編號	1	2	3	4	5	6	7
加載液(mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	19.6	19.6	19.6
洗滌液(mg)	14.9	13.5	15.0	15.0	14.6	14.6	14.3
析出液(mg)	4.8	5.4	5.2	4.8	5.2	4.6	4.8

表 7-3

生產產率							
運行編號	1	2	3	4	5	6	7
加載液(mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	19.6	19.6	19.6
洗滌液(mg)	13.2	16.0	16.4	16.4	17.1	17.2	17.2
析出液(mg)	1.6	1.8	1.8	1.8	2.0	2.0	2.0

【0559】 將管柱在 4℃下儲存約 5 週。自每次產生中溶析出相似量之 MT5，表明管柱具有良好穩定性。

7.5 所產生之 VEGF MiniTrap 之穩定性研究

【0560】 對來自三個管柱(管柱 1、管柱 2 及管柱 3)之溶析級分執行 SDS-PAGE 分析。在非還原及還原 SDS-PAGE 樣本緩衝液中製備樣本，並使用 1X MES (目錄號 NP0322，Invitrogen, Carlsbad, CA)在 4-12%梯度之 NuPage bis-Tris 凝膠上運行。

【0561】 向孔中加載：(1)分子量標準品，(2)加載溶液，(3)來自管柱 1 之管柱洗滌液，(4)來自管柱 2 之溶析級分，(5)來自管柱 1 之溶析級分，(6)來自管柱 3 之溶析級分，(7)在 pH 2.8 下儲存 1 分鐘之 MT5，(8)在 pH 2.8 下儲存 30 分鐘之 MT5，以及(9)分子量標準品(**圖 33** 及**圖 34**)。分析表明，自所有三個親和力管柱(管柱 1-3)之溶析級分中獲得的級分顯示出相似的尺寸分佈，並且親和力管柱之使用不會使 MiniTrap 不穩定。

7.6 宿主細胞蛋白水準之計算

【0562】 使用 CHO HCP ELISA 套組, 3G (F550) (Cygus Technologies)獲得宿主細胞蛋白濃度之標準曲線(**圖 32** 及**表 7-4**)。使用如**圖 32** 所示之標準曲線及**表 7-4** 中列出之曲線公式計算加載溶液及溶析級分中的 HCP 之量。

表 7-4.

曲線公式	**低漸近線**	**斜率**	**EC_{50} (ng/mL)**	**高漸近線**	**R^2**
Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D	0.2	1.9	32.9	2.3	1

【0563】 使用標準曲線計算總 HCP，並且具有宿主細胞蛋白之總量的圖表在**圖 35A** 中示出。**圖 35B** 亦展示與來自管柱 1、2、4 及 5 之洗滌液及溶析級分相比，加載液中的宿主細胞蛋白之總量。使用管柱進行多次運行並且**圖 35B** 中之(#)表示評估級分的運行。

【0564】 使用能夠結合至 MiniTrap 之蛋白質進行的親和力捕獲展示 HCP 自約 7000 ppm 有效降至約 25-50 ppm。如針對產率所觀察到的，具有 $VEGF_{165}$ 之管柱展示來自 HCP 之 MiniTrap 純度高於 mAb1 及 mAb2 管柱所示的。

7.7 在親和產生之前及之後的 VEGF MiniTrap 之 SEC 譜圖

【0565】 將來自三個管柱(管柱 1-3)之溶析級分的 SEC 譜圖與加載溶液中 MiniTrap 之 SEC 譜圖相比較。如**圖 36** 及**表 7-5** 中所見，在親和產生之前或之後的 MT5 之 SEC 譜圖高度相似。

表 7-5.

如圖 36 中之峰編號	滯留時間	峰面積 %	滯留時間	峰面積 %	滯留時間	峰面積 %	滯留時間	峰面積 %
	加載溶液		管柱 1 析出液		管柱 2 析出液		管柱 3 析出液	
1	6.8	1.8	6.8	1.2	6.9	1.1	7.0	1.2
2	7.8	94.6	7.9	97.2	7.9	97.3	7.9	98.3
3	9.4	3.6	10.2	1.7	11.4	1.6	11.3	0.5

7.8 VEGF MiniTrap 管柱前及管柱後樣本與 mAb1、mAb2 及 $VEGF_{165}$ 結合的動力學

【0566】 使用 Biacore T200 儀器進行動力學研究。

【0567】 使用 Biacore T200 儀器，使用即時表面電漿子共振生物感測器測定 VEGF165 與來自管柱 1 及 2 之析出液及加載溶液中之 MiniTrap 結合的平衡解離常數(K_D 值)。所有結合研究均在 25℃下在 10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA 及 0.05% v/v 界面活性劑 Tween-20 pH 7.4 (HBS-ET)運行緩衝液中進行。首先藉由與 mAb1 偶合之胺衍生化 Biacore 感測器表面，以捕獲 MT5。結合研究之草圖表示在**圖 37** 中示出。

【0568】 簡而言之，將來自管柱之析出液及加載溶液稀釋至 HBS-EP (Biacore)緩衝液中，並以~70 RU 之捕獲水準跨固定的蛋白質基質注入。接著以 50 μL/min 之流率注入 $VEGF_{165}$。將等價濃度之分析物同時注入未經處理之參考表面上，以充當空白感測圖，用於減去總體折射率背景。在各週期之間，經由以 25 μL/min 兩次 5-min 注入 10 mM 甘胺酸來使感測器晶片表面再生。接著使用 BIA 評估 4.0.1 軟體評估所得的實驗結合感測圖，以確定動力學速率參數。將每個樣本之資料集擬合至 1:1 朗繆爾模型(Langmuir model)。對於此等研究，在 Global Fit Analysis 方案下分析結合及解離數據，同時選

擇局部擬合最大分析物結合能力(RU)或 Rmax 屬性。在此情況下，軟體計算單個解離常數(kd)、締合常數(ka)及親和常數(Kd)。平衡解離常數為 K_D=kd/ka。藉由使用在 0.03-2 nM 範圍內之不同 $VEGF_{165}$ 濃度來確定動力學結合速率、動力學解離速率及總親和力(**表 7-6**)。根據動力學速率常數將解離半衰期($t_{1/2}$)計算為：$t_{1/2} = \ln(2)/60*Kd$。**表 7-6** 展示在 25℃下親和力層析生產之前及之後獲得的 MT5 與 $VEGF_{165}$ 之結合動力學參數。

【0569】 將由親和力層析產生的 MT5 之親和力(KD)、結合速率(ka，M-1s-1)及解離速率(kd)與加載溶液比較，以評估親和力層析步驟之效果，顯示來自不同樣本之 MT5 的動力學沒有變化。VEGF MiniTrap 構築體之 SPR 感測圖示於**圖 38** 中。

表 7-6.

VEGF MiniTrap 樣本	k_a (10^6 $M^{-1}s^{-1}$)	k_d (10^{-5} s^{-1})	K_D (10^{-12} M)	t½ (min)	Chi^2 (RU^2)	R_{max} (RU)
加載溶液	9.44	1.74	1.84	664	0.10	20
管柱 2 析出液	8.83	1.49	1.69	775	0.17	28
管柱 1 析出液	12.18	1.80	1.48	641	0.18	19

7.9 多個生產週期

【0570】 如 7.3 所示，使用管柱 1 ($hVEGF_{165}$)及管柱 2 (mAb1)進行如藉由步驟 7.1 所得的收穫物之層析產生。將管柱用於多個層析週期。管柱中之產率沒有由於進行額外的運行而顯著變化，表明管柱保留結合能力(**表 7-7**)。

表 7-7.

生產產率								
親和力管柱	**管柱 1**				**管柱 2**			
運行編號	**1**	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**
加載液(mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	21.2	19.7	19.7	19.7
洗滌液(mg)	14.9	13.5	15.0	15.0	13.2	16.0	16.4	16.4
析出液(mg)	4.8	5.4	5.2	4.8	1.6	1.8	1.8	1.8

【0571】 使用 7.4 中所述之方法獲得管柱 1 及 2 之加載溶液、洗滌級分及溶析級分中的 HCP 計算(**圖 39**)。所計算之總 HCP 展示，重複使用管柱不會降低管柱與 MiniTrap 結合之能力。

7.10 最佳化親和力層析管柱

【0572】 使用管柱 1 ($VEGF_{165}$)及管柱 2 (mAb1)進行如部分 7.1 中獲得的收穫物材料之層析產生。為了進行最佳化研究，將 14 mg 或 45 mg 而非 10 mg

之 VEGF165 或抗 VEGF R1 mAb 加載至兩個 HiTrap NHS 激活之 HP 親和力管柱(1 mL，GE Healthcare)上，並封閉管柱以允許偶合在室溫下進行 30 分鐘。如上文 7.2 及 7.3 中所討論，進行管柱製備及包括 MiniTrap 的收穫物之產生。洗滌及溶析級分中的 MT5 之量示於**表 7-8** 中。用 14 mg 或 45 mg ($VEGF_{165}$ 或抗 VEGF R1 mAb (mAb1))偶聯量代替 10 mg 的親和力管柱之比較展示兩個管柱之 MiniTrap 的產率均提高。因此，可藉由最佳化蛋白質與管柱之比率或藉由更改 pH 值、培育時間、培育溫度等來提高偶聯效率，來提高使用所概述方法之管柱產率。

表 7-8.

親和力管柱	**($hVEGF_{165}$)**		**(小鼠抗 VEGF R1 mAb)**	
MW (kDa)	**~ 40 (二聚物)**		**145**	
偶聯量(mg)	10	14	10	45
加載液(mg)	21.2	45.5	21.2	45.5
洗滌液(mg)	14.9	36.8	13.2	29.2
析出液(mg)	~5.0	7.6	~1.8	5.5

7.11 CEX 與親和力層析之結合使用

【0573】 如上文部分 7.3 中所討論，使用管柱 1 產生來自 MT5 表現之細胞培養物樣本。使所獲得之析出液經歷陽離子交換層析(CEX)管柱(HiTrap Capto S，1 mL)。管柱之操作條件示於**表 7-9** 中。

表 7-9.

步驟	**親和力**	**陽離子交換(CEX)**
管柱	親和力管柱，1 mL	HiTrap Capto S，1 mL
加載	MT5 CM2926	20 mM 乙酸鹽，pH 5.0 (加載/洗滌液 1)
洗滌	1X DPBS pH 7.2	10 mM 磷酸鹽，pH 7.0
溶析	Pierce™ IgG 溶析緩衝液	50 mM Tris，62.5 mM $(NH_4)_2SO_4$，pH 8.5
再生/汽提	10 mM 甘胺酸 pH 2.5	50 mM Tris，1 M $(NH_4)_2SO_4$，pH 8.5

【0574】 在原始/起始細胞培養物樣本、親和力層析管柱 1 析出液及 CEX 析出液中之總 HCP 分別為約 230,000 ng/mL、約 9,000 ng/mL 及約 850 ng/mL。如上所提及，使用 Cygnus CHO HCP ELISA 套組 3G 定量測定 HCP 量。

7.12 使用親和力層析產生其他抗 VEGF 蛋白

【0575】　評價管柱 1 以研究其產生其他抗 VEGF 蛋白之能力。將阿柏西普及具有 VEGF 結合潛力之 scFv 片段用於此項研究。產生製程如部分 7.3 中所討論進行。**表 7-10** 證明管柱 1 成功結合並溶析其他抗 VEGF 蛋白。

表 7-10.

親和力管柱 1	scFv	阿柏西普
加載液(mg)	10	20
洗滌液(mg)	4.5	10.6
析出液(mg)	3.6	10.2

實例 8. VEGF MiniTrap 構築體的基於質譜之表徵

材料。VEGF MiniTrap (MT1)如實例 1 中所述由阿柏西普產生。VEGF MiniTrap 5 (MT5)如實例 7 中所述產生。VEGF MiniTrap (MT6)藉由以下方法產生：將重組 VEGF MiniTrap (MT5)之編碼區與信號序列可操作地連接並選殖至哺乳動物表現載體中，轉染至中國倉鼠卵巢(CHO-K1)細胞中，並在用 400 μg/mL 潮黴素選擇 12 天後分離經穩定轉染之池。將在 CDM 中生長的穩定 CHO 細胞池用於產生蛋白質以進行分析。

8.1 醣蛋白之去醣化

【0576】　將來自 MT1、MT2 及 MT3 之經澄清收穫物的樣本在 1% (w/v) RG 界面活性劑(RapiGest SF, Waters, Milford, MA)及 50 mM HEPES (pH 7.9)之 28.8 μL 溶液中稀釋或復原至 0.52 mg/mL 之濃度。將此等溶液經 2 分鐘加熱至大約 95℃，允許冷卻至 50℃，並與 1.2 μL 之 PNGase F 溶液(GlycoWorks Rapid PNGase F, Waters, Milford, MA)混合。藉由將樣本在 50℃下培育 5 分鐘來完成去醣化。

8.2 HILIC-螢光-ESI-MS (MS/MS)分析

【0577】　經由 HILIC 分離組合螢光及質譜偵測對 MT1 進行分析。僅使用 HILIC 分析 MT2 及 MT3。使用配備有光電二極體陣列及螢光(FLR)偵測器並與 Waters Synapt G2-S 質譜儀(MS 條件)連接之 Waters 2D Acquity UPLC 進行層析。將親水相互作用層析(HILIC)分離模式與 150 × 2.1 mm, 1.7 μm 之 Waters UPLC Glycan BEH Amide 管柱一起使用。管柱溫度設定為 60℃，而自動進樣器溫度設定為 5℃。注入體積為 50 μL。光電二極體陣列之掃描範圍為 190–700 nm。FLR 設定為：對於 RapiFluor 標記之聚醣而言，激發 265 nm，發射

425 nm；對於醣肽中存在之酪胺酸而言，激發 274 nm，發射 303 nm。初始流率為 0.4 mL/min，其中流動相 A 包含 100 mM 甲酸銨(pH 4.4)，而流動相 B 為乙腈。

8.3 MS 條件

【0578】 液相層析/質譜(LC/MS)實驗係使用 Waters Synapt G2-S 質譜儀進行。掃描範圍針對正離子模式及負離子模式分析為質荷比 100-2400。掃描時間為 1 s，並且恆定輸注(2 μL/min) glu-血纖維肽 B 作為校準物(「鎖定質量(lock mass)」)。毛細管電壓設定為 2.5 kV，其中源溫度為 120℃，去溶劑化溫度為 500℃。氮氣噴霧器氣體流量設定為 700 l/h。

8.4 天然 SEC-MS

【0579】 將 ACQUITY UPLC I 類系統(Waters, Milford, MA)與 Q Exactive HF 混合四極桿 Orbitrap 質譜儀(Thermo Scientific, Bremen, Germany)耦合，以用於所有隨線 SEC-MS 分析。將 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 管柱(200Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm)設定在 30℃下，並用於蛋白質分離。流動相為 pH 6.8 之 100 mM 乙酸銨。每次分離為 30 分鐘，其中流率為 0.3 mL/min，且注入量設定為 40 μg。以下 MS 參數用於隨線 SEC-nano-ESI-MS 資料獲取。每次獲取為 25 分鐘，在樣本注入後立即開始。將去醣化樣本在 3 kV 噴霧電壓、200℃毛細管溫度及 70 S 鏡頭 RF 位準下以正模式遊離化。源內(In-source) CID 設定為 75 eV。以 15 K 解析力獲取全 MS 掃描，質量範圍介於 *m/z* 2000-8000 之間。將 100 ms 之最大注入時間、3e6 之自動增益控制目標值及 10 次微掃描用於全 MS 掃描。

8.5 肽作圖

【0580】 **用於肽作圖之樣本製備**。藉由添加 500 mmol/L 二硫蘇糖醇(DTT)至 5 mmol/L 之最終濃度，繼之在 4℃下培育 60 分鐘來達成還原。藉由添加 500 mmol/L 碘乙醯胺(IAM)至 10 mmol/L 之最終濃度並在黑暗中於 4℃下培育 60 分鐘來進行烷化。根據製造商說明書，使用 Zeba™ Spin 7 K MWCO 尺寸排阻去鹽管柱(P/N 89882) (Thermo Scientific, Waltham, MA)將變性緩衝液更換為消化緩衝液 (1 mol/L 尿素，在 0.1 mol/L Tris pH 7.8 中)。將重組豬胰蛋白酶(購自 Sigma，目錄號 03708985001)以 1:18 (酶:樣本)質量比(基於

VEGF MiniTrap 蛋白濃度，如在緩衝液交換後藉由 UV-Vis 分光光度法所量測)添加，將 VEGF MiniTrap 蛋白之濃度調節至 0.5 μg/μL 並允許在室溫下培育 4 小時期間進行消化。消化完成時，以 1:1 體積比添加在 LC-MS 級水中之 0.1%甲酸。將消化物在-80℃下儲存直至分析。

【0581】 **胰蛋白酶消化物之 LC-MS/MS 分析**。經由自動進樣器將一或多份 2.5 μg (10 μL)之肽消化物加載至封閉在設定為 40℃之恆溫管柱烘箱中的 C18 管柱上。樣本在排隊注入時保持在 7℃。層析方法係以 98%流動相 A(於水中 0.1%體積分數之甲酸)及 2%流動相 B (於乙腈中 0.1%體積分數之甲酸)開始，其中流率設定在恆定為 0.200 mL/min。洗滌 10 分鐘後，將肽在 110 分鐘之梯度上溶析，其中流動相 B 含量以每分鐘 0.39%之速率升高，以達到包含 45%流動相 B 之最終組成。在下一次樣本注入之前，將管柱用 97%流動相 B 洗滌 15 分鐘，接著在 98%流動相 A 中平衡 25 分鐘。在運行之前 1.5 分鐘及最後 5 分鐘將析出液轉移至廢液。藉由在 214 nm 下之 UV 吸收，繼之在 LTQ Orbitrap Elite 或 Discovery XL 上之質譜法，分析自層析管柱溶析之肽。收集 PS 8670 及 RM 8671 樣本之複製肽作圖資料，以便各自包括三個串聯 MS (MS/MS)分析及一個僅有 MS 之分析。MS/MS 分析係以資料依賴性模式進行以用於肽識別，其中一個實驗週期由以下組成：300 *m/z* 至 2000 *m/z* 之一次全 MS 掃描，繼之五個順序 MS/MS 事件，它們係在啟動該週期之 MS 掃描中以 500 之最小閾值計數偵測到的第一至第五個最強離子上進行。順序質譜法(MS^n) AGC 目標設定為 1E4，其中微掃描 = 3。在質心模式下以正常掃描速率使用離子阱來分析 MS/MS 片段。使用高解析度 FTMS 分析儀(R = 30,000)以輪廓圖模式收集全 MS 掃描，其中全掃描 AGC 目標為 1E6 且微掃描= 1。選擇離子以便使用 2 Da 之隔離寬度進行 MS/MS，接著使用 35 之歸一化 CID 能量、0.25 之激活 Q 值及 10 毫秒之激活時間，藉由與氦氣之碰撞誘導解離(CID)進行片段化。默認電荷狀態設定在 z = 2。若前驅體離子在 30 s 內兩次觸發事件，則將資料依賴性質量放置在排除清單中持續 45 s；排除質量寬度設定在±1 Da。對未經分配之電荷狀態啟用電荷狀態拒絕。拒絕質量清單包括在以下各處之常見污染物：122.08 *m/z*、185.94 *m/z*、355.00 *m/z*、371.00 *m/z*、391.00 *m/z*、413.30 *m/z*、803.10 *m/z*、1222.10 *m/z*、1322.10

m/z、1422.10 *m/z*、1522.10 *m/z*、1622.10 *m/z*、1722.10 *m/z*、1822.10 *m/z* 及 1922.10 *m/z*。進行僅有 MS 之分析以生成 TIC 非還原肽圖及還原圖。

8.6 結果

【0582】 **VEGF MiniTrap 構築體之結構**。VEGF MiniTrap MT1、MT5 及 MT6 之結構描繪於**圖 40**、**圖 41**、**圖 43** 及**圖 44** 中。

【0583】 使用 SEC-MS 進行的初始質量分析證實去醣化之後在完整蛋白質層面上所有三個分子之身份(**圖 42**)。天然 SEC-MS 分析之總離子層析圖(TIC)證明在約 12-13 分鐘時偵測到完整的 VEGF MiniTrap 分子。TIC 之低分子量(LMW)區域之擴展顯示在所有三個蛋白質樣本中均存在 LMW 雜質。

【0584】 VEGF MiniTrap 之去捲積質譜進一步證實它們的身份，並提供資料來闡明主要 PTM 存在於包含 MT1 及 MT5 (**圖 43**)(其為二聚物)及 MT6 (**圖 44**)(其為單鏈蛋白)之樣本中。

【0585】 **MT1 樣本之分析**。提取由包含 MT1 之樣本的 SEC-MS 分析之 TIC 中識別的 LMW 種類，以檢查三種不同的 LMW 雜質- LMW1、LMW2 及 LMW3 (**圖 45A** 及**圖 45B**)。LMW1 種類包含阿柏西普之經截短之種類。LMW2 種類包含樣本中存在之 Fc 雜質，此等雜質係藉由阿柏西普之切割產生，進行該切割以產生 MiniTrap。LMW3 種類包含可能由 MT1 (二聚物)分子上切割之單體。

【0586】 MT1 樣本未顯示 FabRICATOR 酶之存在，該酶已用於切割阿柏西普以形成 MiniTrap 蛋白。該酶若存在，則在約 11.5 及 12.5 分鐘時偵測到。在 MT1 樣本之 SEC-MS 分析期間未偵測到該峰(**圖 46**)。

【0587】 **MT5 樣本之分析**。提取由包含 MT5 之樣本的 SEC-MS 分析之 TIC 中識別的 LMW 種類，以檢查兩種不同的 LMW 雜質- LMW1 及 LMW2 之存在(**圖 47**)。

【0588】 **MT6 樣本之分析**。提取由包含 MT1 之樣本的 SEC-MS 分析之 TIC 中識別的 LMW 種類，以檢查三種不同的 LMW 雜質– LMW1、LMW2 及 LMW3 之存在(**圖 48**)。LMW2 種類包含 MT6 之片段，其中切割產生帶有 G4S 連接子之 VEGF MiniTrap 之片段。LMW5 種類包含 MT6 之片段，其中切割發生在 G4S 連接子之前或之後。

【0589】 MT6 樣本中之聚醣係在 HILIC 層析法中使用由 Waters and the National Institute for Bioprocessing Research and Training (Dublin, Ireland)率先提出之葡萄糖單位值藉由其質量及溶析順序來識別(**圖 49A** 及**圖 49B**)。

【0590】 **遊離硫醇之定量**。VEGF MiniTrap 構築體之半胱胺酸殘基可參與分子內及分子間二硫鍵之形成，或它們可以遊離硫醇形式存在。肽及蛋白質中硫鍵之存在已顯示會對蛋白質施加構象剛性。硫醇可藉由多種試劑及分離技術來偵測。針對三種 VEGF MiniTrap 構築體的極低水準之遊離硫醇的分析示於**表 8-1** 中。

表 8-1.

位置	肽(遊離半胱胺酸之位點)	MT1	MT5	MT6
VEGF R1	ELVIPCR (SEQ ID NO.: 81)	<0.1%	<0.1%	<0.1%
VEGF R2	LVLNCTAR (SEQ ID NO.: 82)	0.3%	0.3%	0.3%
Fc 鉸鏈	THTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 83)	0.0%	0.0%	N/A

【0591】 **三硫化物定量**。與 VEGF MiniTrap 構築體之 Cys 殘基中的遊離硫醇相似，三硫鍵可影響蛋白質之結構。在具有極低遊離硫醇水準之條件下三種 VEGF MiniTrap 構築體之分析示於**表 8-2** 中。

表 8-2.

位置	肽	MT1	MT5	MT6
VEGF R1	ELVIPCR – EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 84)	0.1%	<0.1%	0.1%
VEGF R2	LVLNCTAR - SDQGLYTCAASSGLMTK(K) (SEQ ID NO.: 85)	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Fc 鉸鏈	THTCPPCPAPELLG - THTCPPCPAPELL(G) (SEQ ID NO.: 86)	1.5%	3.7%	N/A

【0592】 **鉸鏈區中之鏈內二硫鍵**。鉸鏈區中的錯配二硫鍵可對 VEGF MiniTrap 構築體之結構、功能及穩定性產生影響。對三種 VEGF MiniTrap 構築體關於在 VEGF MiniTrap 構築體[THTC*PPC*PAPELLG，C*展示可形成鏈內二硫鍵之處]之鉸鏈區中的極低或不存在之鏈內二硫鍵進行的分析示於**表 8-3** 中。

表 8-3.

肽	MT1	MT5	MT6
二硫化物	<0.1%	<0.1%	N/A
三硫化物	<0.1%	<0.1%	N/A

【0593】 **交叉及平行二硫鍵聯異構物之定量**。對於 MT1 及 MT5 (它們為由鉸鏈區中之平行二硫鍵連接的二聚物)，存在異構物之可能性，其中鉸鏈區中之二硫鍵可交叉(**圖 50**)。

【0594】 二硫鍵類型(平行對比交叉)之定量顯示，與作為 FabRICATOR 消化之分子的 MT1 相比，MT2 重組表現之蛋白在 Fc 鉸鏈區中具有稍微較高水準之交叉二硫橋(**表 8-4**)。

表 8-4.

二硫化物	MT1	MT5	MT6
交叉	0.2%	3.9%	N/A
平行	99.8%	96.1%	N/A

翻譯後修飾(PTM)。

表 8-5.

PTM	位點	經修飾之肽		MT1	MT5	MT6
脫醯胺	Asn84 (Asn319)	EIGLLTCEATV**N**GHLYK (SEQ ID NO.: 87)	琥珀醯亞胺	3.1%	3.2%	3.2%
			Asp/iso Asp	21.9%	18.9%	20.9%
	Asn99 (Asn334)	QT**N**TIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 88)	琥珀醯亞胺	4.6%	4.6%	4.0%
			Asp/iso Asp	0.7%	0.5%	0.6%
氧化	Met10	SDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)		1.8%	2.1%	2.1%
	Met20	SDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 65)		2.9%	3.0%	2.7%
	Met245	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 91)		-	-	1.4%
	Met255	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 92)		-	-	2.7%
	Met163 (Met398)	TQSGSE**M**K (SEQ ID NO.: 66)		4.3%	4.3%	3.8%
	Met192 (Met427)	SDQGLYTCAASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 94)		5.0%	5.0%	4.2%
C 端甘胺酸損失	Gly211	THTCPPCPAPELL**G** (SEQ ID NO.: 95)		0.1%	2.0%	-

【0595】 對所有三種 VEGF MiniTrap 構築體中之 PTM 的評估展示水準相當之 PTM (**表 8-5**)。在 Asn84 處觀察到的形成琥珀醯亞胺之脫醯胺在約 3.1-3.2%之範圍內，並且形成天冬胺酸/異天冬胺酸之脫醯胺為 18.9- 21.9%。對於所有三種 VEGF MiniTrap 構築體，觀察到幾個甲硫胺酸殘基(例如，

Met10、Met 20m、Met163 及 Met192)之氧化在約 0.7-6.8%之範圍內。與 MT1 及 MT5 相比包含連接子之 MT6 展示在該連接子上的甲硫胺酸殘基(例如 Met245 及 Met255)之額外氧化。MT1 及 MT5 中約 0.1%及 2.0%之 C 端甘胺酸(Gly211)發生甘胺酸損失。未觀察到缺少 C 端甘胺酸之 MT6。

【0596】 高級醣化終產物修飾與離胺酸及精胺酸醣化有關。VEGF MiniTrap 構築體之醣化會改變其結構及功能，從而導致抗 VEGF 活性受損。

表 8-6.

位點	PTM	MT1	MT5	MT6
Arg5	3-去氧葡醛酮糖	8.0%	8.1%	9.2%
	醣化	0.1%	0.1%	0.1%
	羧甲基化	1.5%	1.4%	1.4%
Arg153	3-去氧葡醛酮糖	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Arg96	3-去氧葡醛酮糖	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys62	醣化	1.1%	1.1%	1.3%
	羧甲基化	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys68	醣化	0.4%	0.3%	0.5%
Lys149	醣化	0.6%	0.5%	0.6%
	羧甲基化	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys185	醣化	<0.1%	<0.1%	<0.1%

【0597】 對所有三種 VEGF MiniTrap 構築體中之修飾的評估展示相當之水準(**表 8-6**)。

【0598】 **經修飾之位點**。如按照部分 8.4 之完整質量分析所闡明，VEGF MiniTrap 構築體上的經修飾之位點使用如部分 8.5 中所說明之還原肽作圖得到證實及定量(**表 8-7**)。對於肽序列 TNYLTHR 之位點 T90N91，**表示在截短後天冬醯胺轉化為天冬胺酸，而對於肽序列 QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK 之位點 N99T100，*表示胰蛋白酶之高水準的無特異性切割。在評估 MT1 及 MT5 期間，發現這兩個截短位點形成 LMW 種類雜質。僅在具有獨特連接子之 MT3 上發現 M245Y246 處之截短，並且該截短係在 MT3 製備期間出現 LMW2 種類雜質之原因。

表 8-7.

位點	肽序列	MT1	MT5	MT6
N99T100	QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK* (SEQ ID NO.: 96)	12.6%	13.2%	13.6%
T90N91	TNYLTHR** (SEQ ID NO.: 97)	0.5%	0.1%	0.3%
M245Y246	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG	-	-	1.8%

位點	肽序列	MT1	MT5	MT6
	GSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 98)			
M10Y11	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 99)	0.2%	1.5%	1.7%

【0599】 **糖位點佔用率之量化**。N-醣化為常見的 PTM。表徵位點特異性 N-醣化(包括 N-聚醣宏觀異質性(醣化位點佔用)及微觀異質性(位點特異性聚醣結構))對於理解醣蛋白之生物合成及功能很重要。醣化程度可視蛋白質之表現方式而變化。對於所有三種 VEGF MiniTrap，在 N36 處之醣化水準係相似的 (**表 8-8** 及**圖 51**)。類似地，對於所有三種 VEGF MiniTrap，在 N68 處之醣化水準亦為相似的(**表 8-8** 及**圖 52**)。對於所有三種 VEGF MiniTrap，在 N123 處之醣化水準亦為相似的(**表 8-8** 及**圖 53**)，但在 MT1 製劑中發現甘露糖-5 升高。對於 VEGF MiniTrap 構築體，與 MT1 相比，MT5 及 MT6 在 Asn196 處之醣化程度較低(**表 8-8** 及**圖 54**)。另外，與 MT4 及 MT6 製劑相比，MT1 製劑中之甘露糖-5 亦為升高的。

表 8-8.

位點	肽	MT1	MT5	MT6
N36	(R)VTSPNITVTLK (SEQ ID NO.: 100)	98.3%	98.1%	99.4%
N68	(K)GFIISNATYK (SEQ ID NO.: 101)	51.9%	55.4%	64.9%
N123	(K)LVLNCTAR (SEQ ID NO.: 102)	99.9%	99.4%	98.4%
N196	(K)NSTFVR (SEQ ID NO.: 103)	98.6%	44.5%	55.1%

【0600】 **N-聚醣之分析**。N36 處之醣化示於**表 8-9**。G2F、G2FS、G2FS2 為在所有三種 VEGF MiniTrap 中所見的主要 N-聚醣。對於**表 8-10** 所示的 N68 處之醣化，G2F 及 G2FS 為在所有三種 VEGF MiniTrap 中所見的主要 N-聚醣。對於**表 8-11** 的 N123 處之醣化，G2F 及 G2S 為在所有三種 VEGF MiniTrap 中所見的主要 N-聚醣，並且與 MT5 及 MT6 相比，在 MT1 中偵測到高水準之甘露糖-5。對於**表 8-12** 中所示的 N196 處之醣化，G2、G2S、G2S2 為在所有三種 VEGF MiniTrap 中所見的主要 N-聚醣，並且與 MT5 及 MT6 相比，在 MT1 中偵測到高水準之甘露糖-5。

表 8-9.

N36 處之聚醣	MT1	MT5	MT6
G0F-GlcNAc	2.0%	1.8%	1.8%
G1F	3.2%	1.0%	1.4%
G1F-GlcNAc	4.8%	4.6%	4.9%
G1FS-GlcNAc	3.1%	3.8%	3.1%

G2F	17.4%	15.1%	19.8%
G2F2S	1.7%	2.0%	2.2%
G2FS	34.2%	31.5%	31.9%
G2FS2	20.4%	25.8%	19.0%
G3FS	2.3%	4.0%	5.5%
G3FS2	2.6%	4.7%	5.0%
G3FS3	1.1%	2.4%	1.9%
G1_Man5+Phos	1.2%	0.3%	0.2%
Man6+Phos	5.7%	2.5%	2.8%

表 8-10.

N68 處之聚醣	**MT1**	**MT5**	**MT6**
G0F-GlcNAc	1.2%	1.1%	1.1%
G1F	5.1%	1.4%	1.7%
G1F-GlcNAc	3.9%	3.9%	4.0%
G1FS	1.2%	0.4%	0.4%
G1FS1-GlcNAc	1.2%	1.6%	1.4%
G2F	27.4%	23.6%	28.6%
G2F2S	2.2%	3.0%	3.4%
G2FS	52.4%	55.2%	50.2%
G2FS2	3.9%	6.9%	5.8%
G3FS	0.5%	1.2%	1.6%
G3FS2	0.4%	1.1%	1.2%

表 8-11.

N123 處之聚醣	**MT1**	**MT5**	**MT6**
G0-GlcNAc	3.5%	3.7%	3.5%
G1-GlcNAc	6.2%	6.8%	6.4%
G1S-GlcNAc	4.1%	3.5%	2.8%
G2	10.6%	16.7%	17.1%
G2F	1.5%	7.2%	7.0%
G2FS	2.1%	13.6%	14.2%
G2S	12.7%	26.1%	25.5%
G2S2	1.3%	5.0%	6.6%
G1_Man4	3.8%	1.3%	1.4%
G1S_Man4	3.9%	2.1%	1.8%
G1_Man5	4.0%	1.2%	1.1%
G1S_Man5	3.2%	1.4%	1.4%
Man4	2.6%	1.9%	1.8%
Man5	35.5%	4.3%	3.1%
Man6	1.1%	0.1%	0.1%
Man7	2.8%	0.1%	0.1%

表 8-12.

N196 處之聚醣	**MT1**	**MT5**	**MT6**
G0-GlcNAc	1.9%	1.8%	1.9%
G1	4.1%	3.6%	4.2%
G1-GlcNAc	1.9%	2.5%	2.4%
G1S-GlcNAc	2.9%	2.6%	1.8%
G2	20.7%	28.2%	32.1%

N196 處之聚醣	MT1	MT5	MT6
G2F	2.0%	5.1%	6.0%
G2FS	2.0%	6.1%	6.2%
G2FS2	0.5%	1.6%	1.3%
G2S	17.7%	31.2%	29.9%
G2S2	4.4%	9.7%	6.7%
G3S	0.1%	0.7%	1.0%
G1S_Man4	1.0%	0.3%	0.3%
G1_Man5	2.3%	0.5%	0.5%
Man3	3.1%	0.7%	0.6%
Man4	2.7%	0.8%	0.6%
Man5	30.4%	3.6%	3.4%

【0601】 **MT3 之連接子處的 O-聚醣**。評估 MT3 之 GS 連接子以研究 MT3 上之 O-聚醣。O-木醣化見於位於 MT3 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIH MTEGR，加下劃線之絲胺酸殘基經醣化)之 GS 連接子上的絲胺酸殘基上。O-聚醣之組成示於**表 8-13** 中。

表 8-13.

組成	質量	註解	數量	水準
木醣化	+132.0		三	<0.1%
			二	1.5%
			單	15%
木糖 + 半乳糖	+294.1		單	0.9%
木糖 + 半乳糖 + 唾液酸	+585.2		單	0.7%

【0602】 **HILIC-FLR-MS 分析**。如部分 8.2 中所述，對所有 VEGF MiniTrap 蛋白進行 HILIC-FLR-MS 分析。分析表明，MT5 及 MT6 之 N-連接聚醣相似，但與針對 MT1 所獲得之 N-連接聚醣不同(**圖 55** 展示全標度及疊加式層析圖，**圖 56** 展示全標度及重疊式層析圖，且**圖 57** 展示全標度、疊加式及歸一化層析圖)。

【0603】 最後，**表 8-14** 及**圖 58A-C** 中分別列出所有三種 VEGF MiniTrap 蛋白之醣化百分比以及詳細的聚醣識別及定量。如在所有聚醣分析中所觀察到的，MT5 與 MT6 之醣化譜及甘露糖水準相似，但與 MT1 不同。

表 8-14.

	MT1	MT2	MT3
岩藻醣化%	42.9%	57.8%	57.2%
半乳醣化%	71.6%	92.9%	93.7%
唾液酸化%	33.1%	47.6%	44.8%

高甘露糖%	17.6%	2.6%	2.3%
平分% (% Bisecting)	1.9%	0.4%	0.4%

實例 9. 使用上游培養基之生產及顏色定量以及進料製程最佳化

(A) 未最佳化之 CDM (對照生物反應器)

【0604】 使用實例 5 中所述的 MiniTrap 之製造。

【0605】 研究步驟之操作參數係熟習此項技術之普通技術人員已知的。

【0606】 第 0 天之培養基 = CDM1，並且包括以下營養素、抗氧化劑及金屬：

- 以 8-9 mM 之累積濃度添加半胱胺酸
- 下面以 1x 濃度(此處之濃度係在接種物添加之前)列出起始培養基中之金屬：
  - Fe = 每升培養物 68-83 微莫耳
  - Zn = 每升培養物 6-7 微莫耳
  - Cu = 每升培養物 0.1-0.2 微莫耳
  - Ni = 每升培養物 0.5-1 微莫耳

【0607】 在收穫 MT1 時，遵循如**圖 59** 中所示之生產程序。層析之操作參數係熟習此項技術之普通技術人員已知的。用於親和力捕獲(**圖 59** 之步驟 3)、親和力流通(**圖 59** 之步驟 5)、AEX (**圖 59** 之步驟 8)及 HIC (**圖 59** 之步驟 9)之操作參數概述於 **表 9-1** 中。在親和力捕獲及過濾步驟之後，使用實例 1.2 中概述之程序進行阿伯西普之蛋白水解切割。

表 9-1.

步驟	**親和力捕獲**	**親和力流通**	**AEX**	**HIC**
樹脂	MabSelect SuRe	MabSelect SuRe	POROS 50 HQ	Capto Phenyl HS
加載	30 g/L 樹脂	30 g/L 樹脂 pH 6.80 – 7.20	40 g/L 樹脂 pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	100 g/L 樹脂 pH 4.40 – 4.60 7.50 – 10.50 mS/cm
平衡	20 mM 磷酸鈉 pH 7.10 – 7.30，2.60 – 3.20 mS/cm	26 mM Tris，16 mM 磷酸鈉，18 mM 乙酸鹽 pH 6.90 – 7.10，2.00 – 4.00 mS/cm	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10 mS/cm	40 mM Tris，30 mM 檸檬酸鈉，74 mM 乙酸鹽 pH 4.40 – 4.60，7.50 – 10.50 mS/cm
洗滌 1	10 mM 磷酸鈉，500 mM NaCl pH 7.10 –	26 mM Tris，16 mM 磷酸鈉，18 mM 乙酸鹽 pH	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50，1.90 – 2.10	40 mM Tris，30 mM 檸檬酸鈉，74 mM 乙酸鹽 pH

步驟	親和力捕獲	親和力流通	AEX	HIC
	7.30，40 – 50 mS/cm	6.90 – 7.10，2.00 – 4.00 mS/cm	mS/cm	4.40 – 4.60，7.50 – 10.50 mS/cm
洗滌 2	20 mM 磷酸鈉 pH 7.10 – 7.30，2.60 – 3.20 mS/cm	N/A	N/A	N/A
溶析	40 mM 乙酸 pH 2.80 – 3.20，0.28 – 0.36 mS/cm	40 mM 乙酸 pH 2.80 – 3.20，0.28 – 0.36 mS/cm	N/A	N/A
再生/汽提 1	500 mM 乙酸，pH 2.25 – 2.65，0.90 – 1.25 mS/cm	500 mM 乙酸，pH 2.25 – 2.65，0.90 – 1.25 mS/cm	2 M 氯化鈉 (NaCl)	專屬緩衝液
再生/汽提 2	N/A	N/A	1 N 氫氧化鈉 (NaOH)	N/A

【0608】 **表 9-2** 展示在進行各種層析步驟時獲得的池之顏色定量。使用來自蛋白質濃度為 5 g/L 之池的樣本進行顏色定量。

【0609】 親和力捕獲池係指在進行親和力捕獲步驟(**圖 59** 之步驟 3)時收集之析出液。酶池係指在進行酶切割步驟(**圖 59** 之步驟 4)時收集之流通液。親和力流通池係指在進行親和力流通步驟(**圖 59** 之步驟 5)時收集之流通液，而親和力流通析出液係指在進行親和力流通步驟(**圖 59** 之步驟 5)時收集之析出液。AEX 池及 AEX 汽提液係指在進行陰離子交換層析步驟(**圖 59** 之步驟 8)時獲得之流通及汽提級分。HIC 池係指在進行疏水性相互作用層析步驟(**圖 59** 之步驟 9)時收集之流通液。

【0610】 如**表 9-2** 中所見的每個步驟均展示著色減少(如由池之 b*值減小所觀察到)。例如，在進行親和力流通層析時，流通級分具有 2.16 之 b*值(與由親和力捕獲步驟收集之流通液的 2.52 之 b*值相比減小的)。AEX 分離後之流通液及洗滌液進一步減少著色，如藉由 b*值自 2.16 降至 0.74 所觀察到。如所預期的，汽提 AEX 管柱產生帶有黃棕色之樣本，該顏色比來自 AEX 分離後之流通液及洗滌液之著色顯著更強，如由 b*值可見(8.10 對比 0.74)。最後，HIC 步驟進一步提供著色減少(b*值可針對 5 g/L 蛋白質濃度進行歸一化，該 b*值來自在 28.5 g/L 蛋白質濃度下之 HIC 池所獲得之 b*值)。

表 9-2. 各個生產步驟處之樣本的顏色定量

樣本	濃度(g/L)	L*	a*	b*
親和力捕獲池	5.0 ± 0.1	98.75	-0.12	2.52

樣本	濃度(g/L)	L*	a*	b*
酶切割池	5.0 ± 0.1	99.03	-0.07	1.61
親和力流通池	5.0 ± 0.1	98.95	-0.08	2.16
親和力流通析出液	5.0 ± 0.1	98.92	-0.01	0.83
AEX 池	5.0 ± 0.1	99.72	-0.03	0.74
AEX 2 M NaCl 汽提液	5.0 ± 0.1	96.25	-0.42	8.10
HIC 池	28.5	98.78	-0.28	3.11

【0611】 **(B) 最佳化之 CDM (低半胱胺酸、低金屬及增加之抗氧化劑生物反應器)**

【0612】 使用以下方案評估降低之半胱胺酸濃度、降低之金屬濃度及增加之抗氧化劑對著色之影響：

【0613】 第 0 天之培養基= CDM1

○ 以 5-6 mM 之累積濃度添加半胱胺酸

● 將抗氧化劑添加至 CDM1 中，以達到以下累積濃度(其中濃度為接種物添加之前的濃度)：

○ 牛磺酸 = 10 mM 之培養物

○ 甘胺酸 = 10 mM 之培養物

○ 硫辛酸 = 0.0024 mM 之培養物

○ 維生素 C (抗壞血酸) = 0.028 mM 之培養物

● 下面以 1x 水準列出起始培養基中之金屬。

○ Fe = 每升培養物 68-83 微莫耳

○ Zn = 每升培養物 6-7 微莫耳

○ Cu = 每升培養物 0.1-0.2 微莫耳

○ Ni = 每升培養物 0.5-1 微莫耳。

○ 所有金屬之減少，包括使用 0.25x 上文針對培養基所示之濃度。

【0614】 在收穫 MT1 樣本時，遵循如**圖 59** 所示之生產程序。層析之操作參數係熟習此項技術之普通技術人員已知的。**表 9-1** 中概述用於親和力捕獲、親和力流通及 HIC 之操作參數。在親和力捕獲及過濾步驟之後，使用實例 1.2 中概述之程序進行阿伯西普之蛋白水解切割。

【0615】 **表 9-3** 展示在進行各種層析步驟時獲得的池之顏色定量。使用來自蛋白質濃度為 5 g/L 之池的樣本進行顏色定量。如**表 9-3** 中所示之步驟提供與**表 9-2** 中之步驟所見類似的生產。

表 9-3. MiniTrap 之各個生產步驟處之樣本的顏色定量

樣本	濃度(g/L)	L*	a*	b*
親和力捕獲池	5.0 ± 0.1	99.18	-0.09	1.77
酶切割池	5.0 ± 0.1	99.44	-0.06	1.17
親和力流通池	5.0 ± 0.1	99.32	-0.10	1.58
親和力流通析出液	5.0 ± 0.1	99.74	-0.05	0.60
AEX 池	5.0 ± 0.1	99.63	-0.07	0.50
AEX 2 M NaCl 汽提液	5.0 ± 0.1	97.63	-0.49	6.10
HIC 池	27.6	99.07	-0.29	2.32

【0616】 比較**表 9-2** 與**表 9-3**，很明顯，與「對照生物反應器條件」 (b*值為 2.52)相比，「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」在親和力捕獲池中具有較低的顏色(b*值為 1.77)。

【0617】 預計濃度為 160 g/L 之 MT 樣本(使用**表 9-2** 及**表 9-3** 中列出之步驟形成 MT)對於「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」具有 13.45 之 b*值且對於「對照生物反應器條件」具有 17.45 之 b*值。經由最佳化上游培養基及進料，達成 23%顏色減少。類似地，預計濃度為 110 g/L 之 MT 樣本(使用**表 9-2** 及**表 9-3** 中列出之步驟形成 MT)對於「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」具有 9.25 之 b*值且對於「對照生物反應器條件」具有 12 之 b*值。

【0618】 為了理解每個生產單元操作如何有助於減少顏色，將每個生產製程中間物之 b*值計算為親和力捕獲池之顏色百分比(**表 9-4**)。

表 9-4.

	樣本	濃度(g/L)	b*	Δb*	b* (作為親和力捕獲池之%)
對照生物反應器	親和力捕獲池	5.0 ± 0.1	2.52	N/A	100.0
	酶切割池	5.0 ± 0.1	1.61	-0.91	63.8
	親和力流通池	5.0 ± 0.1	2.16	0.55	85.7
	AEX 池	5.0 ± 0.1	0.74	-1.42	29.4
	HIC 池	5.0 ± 0.1	0.55	-0.19	21.8
低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生	親和力捕獲池	5.0 ± 0.1	1.77	N/A	100.0
	酶切割池	5.0 ± 0.1	1.17	-0.60	66.1
	親和力流通池	5.0 ± 0.1	1.58	0.41	89.2

	樣本	濃度(g/L)	b*	Δb*	b* (作為親和力捕獲池之%)
物反應器	AEX 池	5.0 ± 0.1	0.50	-1.08	28.2
	HIC 池	5.0 ± 0.1	0.42	-0.08	23.7

【0619】 AEX 單元操作提供最多的顏色減少(b*值變化自 1.08 至 1.42)，而 HIC 單元操作提供一些額外的顏色減少(b*值變化自 0.08 至 0.19)。所評估之單元操作總體上移除親和力捕獲池中存在的 76.3%– 78.2%之顏色。

【0620】 亦關於以下指標對「對照生物反應器條件」以及「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」之各種生產製程中間物之顏色進行研究：藉由蛋白酶消化產生的寡肽中之 2-側氧基-組胺酸之百分比及側氧基-色胺酸之百分比，如藉由質譜法所量測，如**表 9-5** 及**表 9-6** 中分別所示。如實例 3 中所討論進行肽作圖。

【0621】 參看**表 9-5**，在比較不同生產步驟中池中之組胺酸氧化水準時，很明顯，隨著生產過程之進展，池中形成的 MT 之組胺酸氧化水準百分比之相對豐度降低。例如，對於「對照生物反應器條件」下之 H209，組胺酸氧化水準之百分比對於酶切割池為 0.062，且對於 AEX 流通液，其降至 0.029，並且對於 HIC 池，進一步降至 0.020。類似地，對於「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」下之 H209，組胺酸氧化水準之百分比對於酶切割池為 0.039，且對於 AEX 流通液，其降至 0.023，並且對於 HIC 池，進一步降至 0.016。因此，生產策略導致 MT 中組胺酸氧化水準之百分比的降低。隨著著色之減少，樣本中一些經氧化殘基之存在亦減少。與組胺酸氧化相似，在「對照生物反應器條件」以及「低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件」下的不同生產步驟中，亦對池之色胺酸氧化水準進行追蹤(**表 9-6**)。

表 9-5

	級分	顏色 (b*)	組胺酸氧化水準(%)					
			H19 (+14)	H86 (+14)	H95 (+14)	H110 (+14)	H145 (+14)	H209 (+14)
對照生物反應器條件	酶切割池	1.61	0.023	0.018	0.011	0.014	0.007	0.062
	親和力流通池(AEX 加載液)	2.16	0.030	0.027	0.018	0.015	0.011	0.067
	親和力流通	0.83	0.030	0.022	0.000	0.018	0.004	0.046

	級分	顏色(b*)	組胺酸氧化水準(%)					
			H19 (+14)	H86 (+14)	H95 (+14)	H110 (+14)	H145 (+14)	H209 (+14)
	析出液							
	AEX 流通液	0.74	0.026	0.025	0.013	0.016	0.010	0.029
	AEX 2 M NaCl 汽提液	8.10	0.024	0.063	0.033	0.019	0.012	0.063
	HIC 池	0.55	0.018	0.009	0.002	0.021	0.005	0.020
低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件	酶切割池	1.17	0.019	0.017	0.009	0.014	0.008	0.039
	親和力流通池(AEX 加載液)	1.58	0.026	0.025	0.013	0.014	0.010	0.043
	親和力流通析出液	0.60	0.031	0.017	0.007	0.020	0.003	0.016
	AEX 流通液	0.50	0.020	0.022	0.009	0.014	0.010	0.023
	AEX 2 M NaCl 汽提液	6.10	0.020	0.055	0.025	0.016	0.011	0.042
	HIC 池	0.42	0.013	0.009	0.002	0.017	0.003	0.016

表 9-6.

	級分	顏色(b*)	色胺酸氧化水準(%)						
			W58 (+4)	W58 (+16)	W58 (+32)	W58 (+48)	W138 (+4)	W138 (+16)	W138 (+32)
對照生物反應器條件	酶切割池	1.61	0.006	0.032	0.289	0.000	0.020	1.093	0.106
	親和力流通池(AEX 加載液)	2.16	0.016	0.055	0.327	0.000	0.017	0.771	0.111
	親和力流通析出液	0.83	0.009	0.031	0.453	0.000	0.025	1.039	0.132
	AEX 流通液	0.74	0.014	0.038	0.283	0.000	0.023	0.720	0.120
	AEX 2 M NaCl 汽提液	8.10	0.043	0.089	0.462	0.000	0.031	0.620	0.175
	HIC 池	0.55	0.037	0.126	0.413	0.000	0.020	0.656	0.274
低半胱胺酸、低金屬及增加的抗氧化劑之生物反應器條件	酶切割池	1.17	0.009	0.027	0.239	0.001	0.027	1.026	0.136
	親和力流通池(AEX 加載液)	1.58	0.013	0.045	0.284	0.000	0.021	0.628	0.107
	親和力流通析出液	0.60	0.003	0.026	0.421	0.021	0.025	1.032	0.132
	AEX 流通液	0.50	0.011	0.031	0.235	0.000	0.022	0.676	0.102
	AEX 2 M NaCl 汽提液	6.10	0.034	0.073	0.478	0.000	0.032	0.635	0.169
	HIC 池	0.42	0.029	0.122	0.355	0.000	0.022	0.800	0.236

序列表

【0622】　**本申請案含有序列表，該序列表已以 ASCII 格式以電子方式提交且由此**以引用之方式全部併入。2020 年 8 月 13 日創建之該 ASCII 複本名為 070816-02201_SL.txt 且大小為 134,385 位元組。

序列表

<110> 美商再生元醫藥公司(REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 抗 VEGF 蛋白組合物及其製備方法

<130> 070816-02351

<140> 109128140
<141> 2020-08-18

<150> US 62944635
<151> 2019-12-06

<150> US 63065012
<151> 2020-08-13

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 1

```
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95
```

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 2
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 2

```
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
```

195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 3
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 3
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 4
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 4
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 5
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 5
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val

```
1               5                   10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
        195                 200                 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
    210                 215                 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
                245                 250                 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
```

260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 6
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 6
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 7
<211> 339
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 7

```
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
        195                 200                 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
    210                 215                 220
```

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 8
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 8
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr

65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn

325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 9
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 9
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 10
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 10
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

```
Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
        195                 200                 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
    210                 215                 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
                245                 250                 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
            260                 265                 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
        275                 280                 285
```

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 11
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 11
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys

130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 12
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源

〈223〉 /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

〈400〉 12

```
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
        195                 200                 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
    210                 215                 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225                 230                 235                 240
```

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 13
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 13
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 14
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 14

```
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
        35                  40                  45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
    50                  55                  60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
        115                 120                 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
    130                 135                 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
                165                 170                 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
            180                 185                 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
```

195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 15
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 15
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 16
<211> 339
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 16
Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asp Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 17
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 18
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 19
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
1 5 10 15

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
20

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 20
Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys His Gln His Lys

20

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 21
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
1 5

<210> 22
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 22
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 23
Val His Glu Lys Asp Lys
1 5

<210> 24
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 24
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1   5   10   15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
            20

<210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 25
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1   5   10   15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
            20

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 26
Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
1   5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源

<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 27
Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr
1 5 10 15

Lys

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 28
Ile Ile Trp Asp Ser Arg
1 5

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 29
Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 30

Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 31
Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 32
Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (8)..(8)
<223> /替換=「Pro」

<220>
<221> 變異體
<222> (173)..(173)
<223> /替換=「Thr」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(227)
<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 33

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Ala Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220
```

Pro Gly Lys
225

<210> 34
<211> 103
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 34
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp
100

<210> 35
<211> 93
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 35
Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr
1 5 10 15

Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile

20 25 30

Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly
35 40 45

Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala
50 55 60

Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly
65 70 75 80

His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr
85 90

<210> 36
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 36
Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
1 5 10 15

Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp
20 25 30

Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val
35 40 45

Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu
50 55 60

Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr
65 70 75 80

Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe
85 90 95

Val Arg Val His Glu Lys
100

<210> 37
<211> 97
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 37
Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr
1 5 10 15

Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro
20 25 30

Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His
35 40 45

Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg
50 55 60

Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu
65 70 75 80

Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val Pro Pro Gly Pro
85 90 95

Gly

<210> 38
<211> 92
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 38
Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val
1 5 10 15

Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro
20 25 30

Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr
35 40 45

Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp

50 55 60

Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Lys Ser Glu Lys
65 70 75 80

Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val Pro
85 90

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 39
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 40
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 41
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

<210> 42

<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 42
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 43
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 44
Asp Lys Thr His Thr Cys
1 5

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro
1 5 10

<210> 46
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 46
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
210 215 220

<210> 47
<211> 315
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 47
Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
1 5 10 15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
20 25 30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
35 40 45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
50 55 60

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val
65 70 75 80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn
85 90 95

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser
100 105 110

Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn
115 120 125

Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His
130 135 140

Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met
145 150 155 160

Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp

165 170 175

Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys
180 185 190

Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Asn Leu Ser Val Ala Phe Gly
195 200 205

Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg
210 215 220

Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr
225 230 235 240

Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His
245 250 255

Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr
260 265 270

Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val
275 280 285

Ser Leu Val Val Tyr Val Pro Pro Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr
290 295 300

Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
305 310 315

<210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 48
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys
210

<210> 49
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 49
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215

<210> 50
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 50
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu

1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

<210> 51
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源

〈223〉 /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

〈400〉 51

```
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1               5                  10                  15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
            20                  25                  30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
    50                  55                  60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65                  70                  75                  80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
                85                  90                  95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
            100                 105                 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
        115                 120                 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
                165                 170                 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
            180                 185                 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Thr Gly Arg
225                 230                 235                 240
```

Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr
245 250 255

Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile
260 265 270

Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly
275 280 285

Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala
290 295 300

Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly
305 310 315 320

His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile
325 330 335

Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly
340 345 350

Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly
355 360 365

Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys
370 375 380

Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys
385 390 395 400

Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly
405 410 415

Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser
420 425 430

Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
435 440

<210> 52
<211> 425
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 52

```
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1               5                  10                  15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
            20                  25                  30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
    50                  55                  60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65                  70                  75                  80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
                85                  90                  95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
            100                 105                 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
        115                 120                 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
                165                 170                 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
            180                 185                 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Thr Gly
    210                 215                 220

Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
225                 230                 235                 240

Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn
                245                 250                 255
```

Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp
260 265 270

Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn
290 295 300

Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr
305 310 315 320

Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val
325 330 335

Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
340 345 350

Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys
355 360 365

Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
370 375 380

Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln
385 390 395 400

Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn
405 410 415

Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
420 425

<210> 53
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 53
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val

20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Thr Gly Arg Pro
245 250 255

Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
260 265 270

Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr

275 280 285

Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
290 295 300

Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
305 310 315 320

Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
325 330 335

Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
340 345 350

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
355 360 365

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
370 375 380

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
385 390 395 400

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
405 410 415

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
420 425 430

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
435 440 445

Phe Val Arg Val His Glu Lys
450 455

<210> 54
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 54
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe
260 265 270

Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly
275 280 285

Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val
290 295 300

Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg
305 310 315 320

Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr
325 330 335

Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu
340 345 350

Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp
355 360 365

Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
370 375 380

Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp
385 390 395 400

Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val
405 410 415

Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu
420 425 430

Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr
435 440 445

Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe
450 455 460

Val Arg Val His Glu Lys
465 470

<210> 55
<211> 432
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 55

```
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1               5                  10                  15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
            20                  25                  30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
    50                  55                  60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65                  70                  75                  80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
                85                  90                  95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
            100                 105                 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
        115                 120                 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
                165                 170                 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
            180                 185                 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
        195                 200                 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
    210                 215                 220

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
225                 230                 235                 240

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                245                 250                 255
```

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
260 265 270

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
275 280 285

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
290 295 300

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
325 330 335

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
355 360 365

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
370 375 380

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
385 390 395 400

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
405 410 415

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420 425 430

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 56
Ile Ile Trp Asp Ser Arg
1 5

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 57
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 58
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
1 5 10 15

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
20

<210> 59
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 59
Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys His Gln His Lys
20

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 60
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 61
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 62
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 63
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 63
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
1 5 10 15

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
20

<210> 64
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 64
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 65
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 65
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 66
Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
1 5

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 67
Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr
1 5 10 15

Lys

<210> 68
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 68
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 69
Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys
1 5 10

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 70
Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
1 5 10

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 71
Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg
1 5 10

<210> 72
<211> 165
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 72
Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
145 150 155 160

Asp Lys Pro Arg Arg
165

<210> 73
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 74
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Thr Thr Ser Gln Asp Ser Asn Asn Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 75
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 76
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 76
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ser Asn Lys Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

```
        35                  40                  45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 77
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 77

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 78
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 78
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Thr Thr Ser Gln Asp Ser Asn Asn Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 79
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 80
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 80
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ser Asn Lys Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
195 200

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 81
Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 82
Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg
1 5

<210> 83
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 83
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 84
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 84
Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala
1 5 10 15

Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
20

<210> 85
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (26)..(26)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(26)
<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 85
Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys
20 25

<210> 86
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (28)..(28)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(28)
<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 86
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Thr His
1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
20 25

<210> 87
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 87
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr
1 5 10 15

Lys

<210> 88
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 88
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
1 5 10 15

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
20

<210> 89
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 89
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 90
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 90
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 91
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 91
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp
20 25 30

Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
35 40 45

His Met Thr Glu Gly Arg
50

<210> 92
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 92
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp
20 25 30

Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
35 40 45

His Met Thr Glu Gly Arg
50

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 93
Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
1 5

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 94
Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr
1 5 10 15

Lys

<210> 95
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 95
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1   5   10

<210> 96
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 96
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
1   5   10   15

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys
            20

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「關於取代及較佳實施例之詳細描述參見所提交之說明書」

<400> 97
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
1   5

<210> 98
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 98
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp
20 25 30

Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
35 40 45

His Met Thr Glu Gly Arg
50

<210> 99
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 99
Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg
20

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(1)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(12)

<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 100
Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys
1 5 10

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(1)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(11)
<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 101
Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys
1 5 10

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(1)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(9)

<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」

<400> 102
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg
1 5

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 來源
<223> /注釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(1)
<223> /替換=「 」

<220>
<221> 位點
<222> (1)..(7)
<223> /注釋=「序列中給出之變異體殘基相對於註解中之彼等殘基對於變異體位置沒有偏好」
<400> 103
Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種產生阿柏西普(aflibercept)之方法，該方法包含：

(a) 在化學成分確定之培養基(CDM)中產生培養的細胞之經澄清之收穫物；

(b) 使來自該經澄清之收穫物的阿柏西普與蛋白 A 樹脂結合，其中該阿柏西普包含具有至少一個經氧化之胺基酸殘基的變異體，該經氧化之胺基酸殘基選自由以下組成之群組：甲硫胺酸、色胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及其組合；

(c) 溶析步驟(b)之該阿柏西普，從而形成親和析出液，其中該析出液具有第一顏色；

(d) 使包含阿柏西普之該析出液經歷陰離子交換層析(AEX)管柱；以及

(e) 收集流通級分，其中該流通級分具有第二顏色，且其中當將該親和析出液及流通級分之蛋白質濃度歸一化時，該親和析出液之該第一顏色為比該流通級分之該第二顏色更強烈之黃棕色。

【請求項 2】 如請求項 1 之方法，其中該細胞選自由以下組成之群組：CHO、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

【請求項 3】 如請求項 1 之方法，其中該經氧化之胺基酸殘基為組胺酸。

【請求項 4】 如請求項 1 之方法，其中該經氧化之胺基酸殘基為色胺酸。

【請求項 5】 一種自經澄清之細胞收穫物產生阿柏西普之方法，該細胞在化學成分確定之培養基(CDM)中培養，該方法包含：

(a) 使來自該經澄清之收穫物的阿柏西普與蛋白 A 樹脂結合；

(b) 溶析步驟(a)之該阿柏西普，從而形成親和析出液，其中該析出液包含阿柏西普之酸性種類；

(c) 使該經析出之阿柏西普經歷陰離子交換(AEX)層析管柱；以及

(d) 收集一或多個流通級分，且其中當將該親和析出液及流通級分中之蛋白質濃度歸一化至 10.0 g/L 時，在步驟(b)之該親和析出液中的阿柏西普之酸性種類百分比大於在步驟(d)之該一或多個流通級分中的阿柏西普之酸性種類百分比，且

其中阿柏西普之該酸性種類對應於阿柏西普之陽離子交換層析(CEX)層析圖中比主峰更早溶析之峰，且其中使用 20 mM 2-(N-嗎福啉代)乙磺酸(MES) pH 5.7 之第一流動相及 40 mM 磷酸鈉、100 mM 氯化鈉、pH 9.0 之第二流動相(流動相 B)生成該層析圖，且其中使用 280 nm 下之偵測生成該層析圖。

【請求項 6】 如請求項 5 之方法，其中阿柏西普之該酸性種類包含具有至少一個選自由以下組成之群組的經氧化之胺基酸殘基的阿柏西普：甲硫胺酸、色胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及其組合。

【請求項 7】 如請求項 5 之方法，其進一步包含在結合來自該經澄清之收穫物的阿柏西普之後，使阿柏西普經歷選自由以下組成之群組的一或多個其他層析步驟：陽離子交換層析(CEX)、疏水性相互作用層析、尺寸排阻層析及其組合。

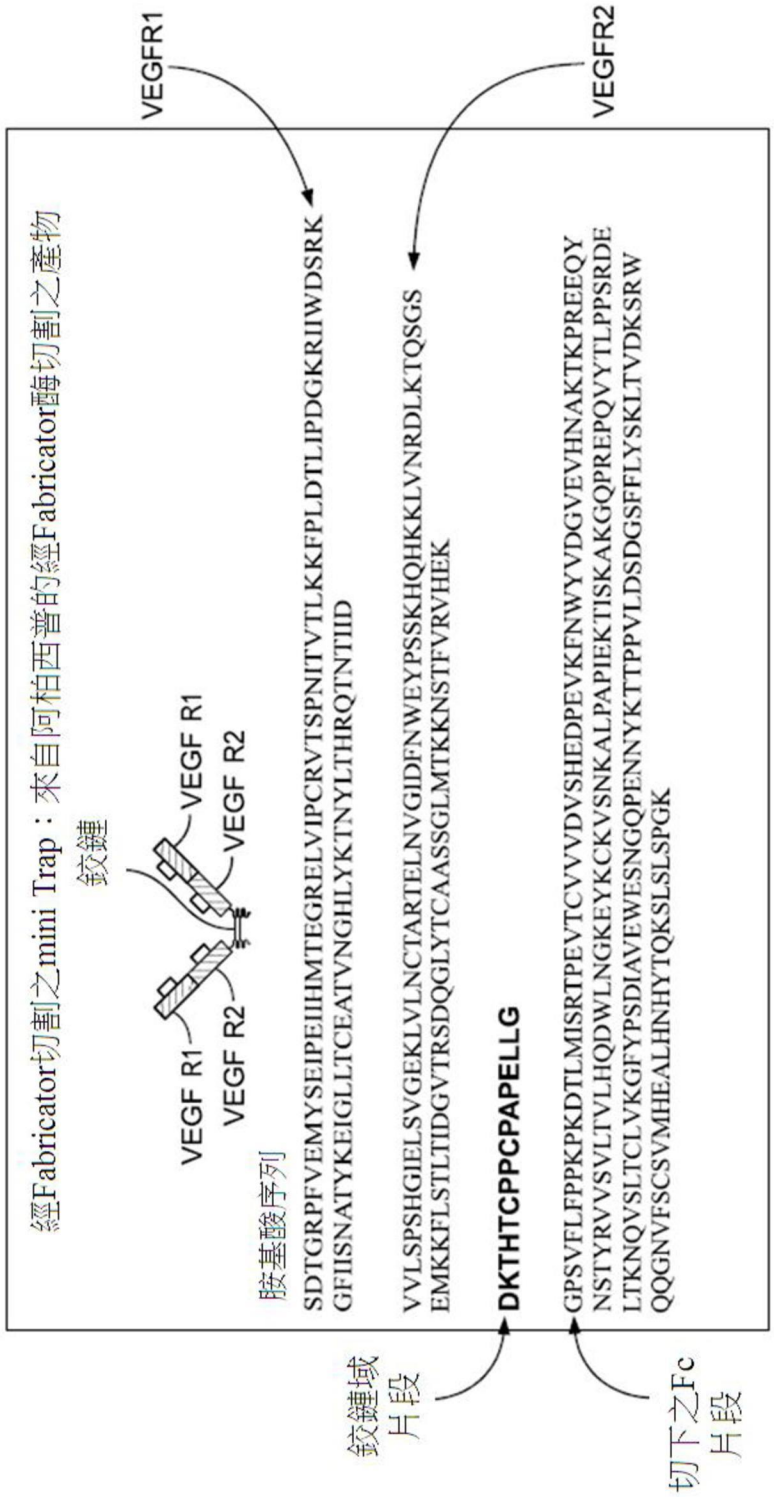
【請求項 8】 如請求項 5 之方法，其中該細胞選自由以下組成之群組：CHO、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

【請求項 9】 如請求項 6 之方法，其中該細胞選自由以下組成之群組：CHO、NS0、Sp2/0、胚胎腎細胞及 BHK。

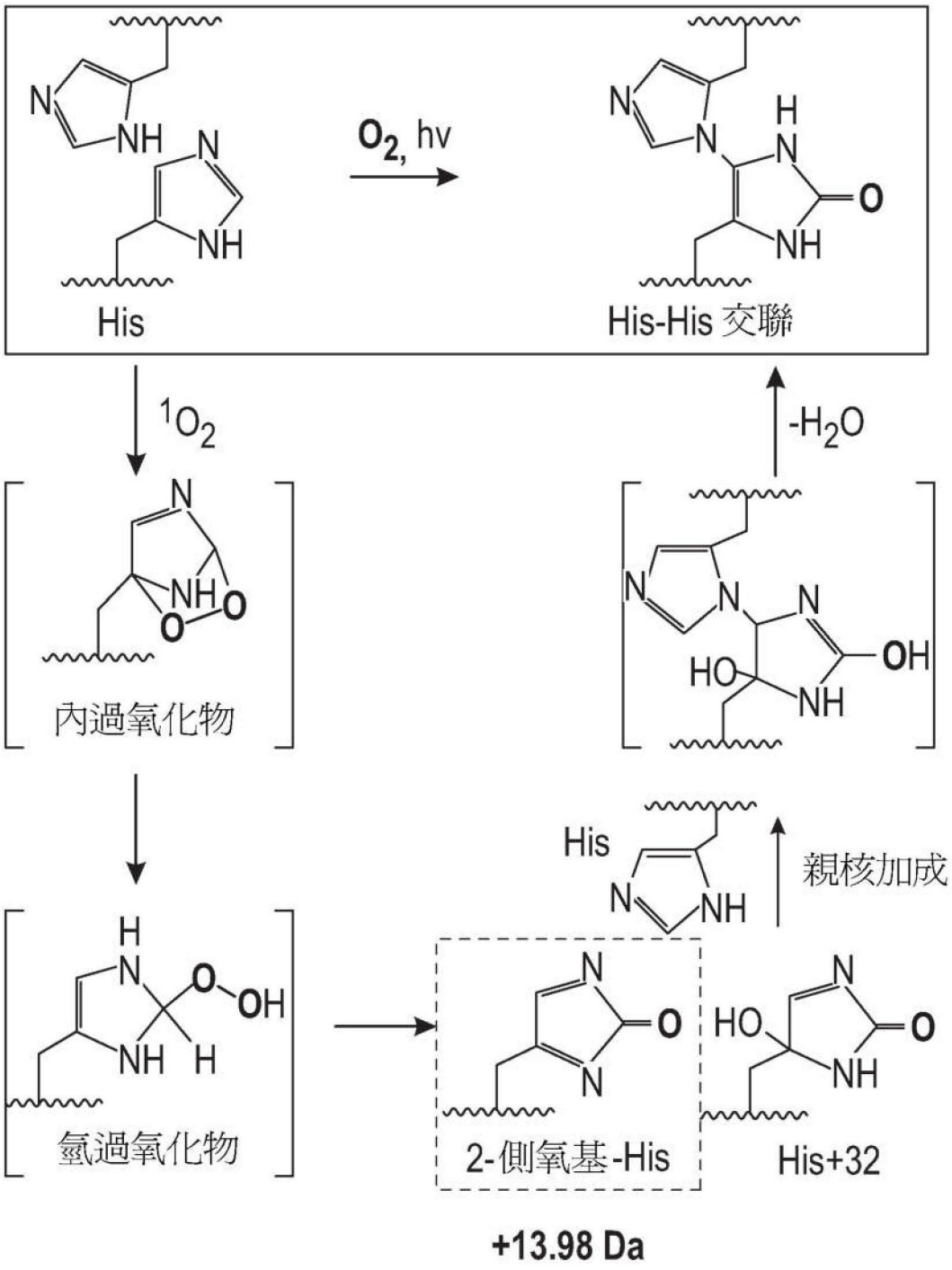
【請求項 10】 如請求項 6 之方法，其中阿柏西普之該酸性種類包含具有至少一個組胺酸之經氧化之胺基酸殘基的阿柏西普。

【請求項 11】 如請求項 6 之方法，其中阿柏西普之該酸性種類包含具有至少一個色胺酸之經氧化之胺基酸殘基的阿柏西普。

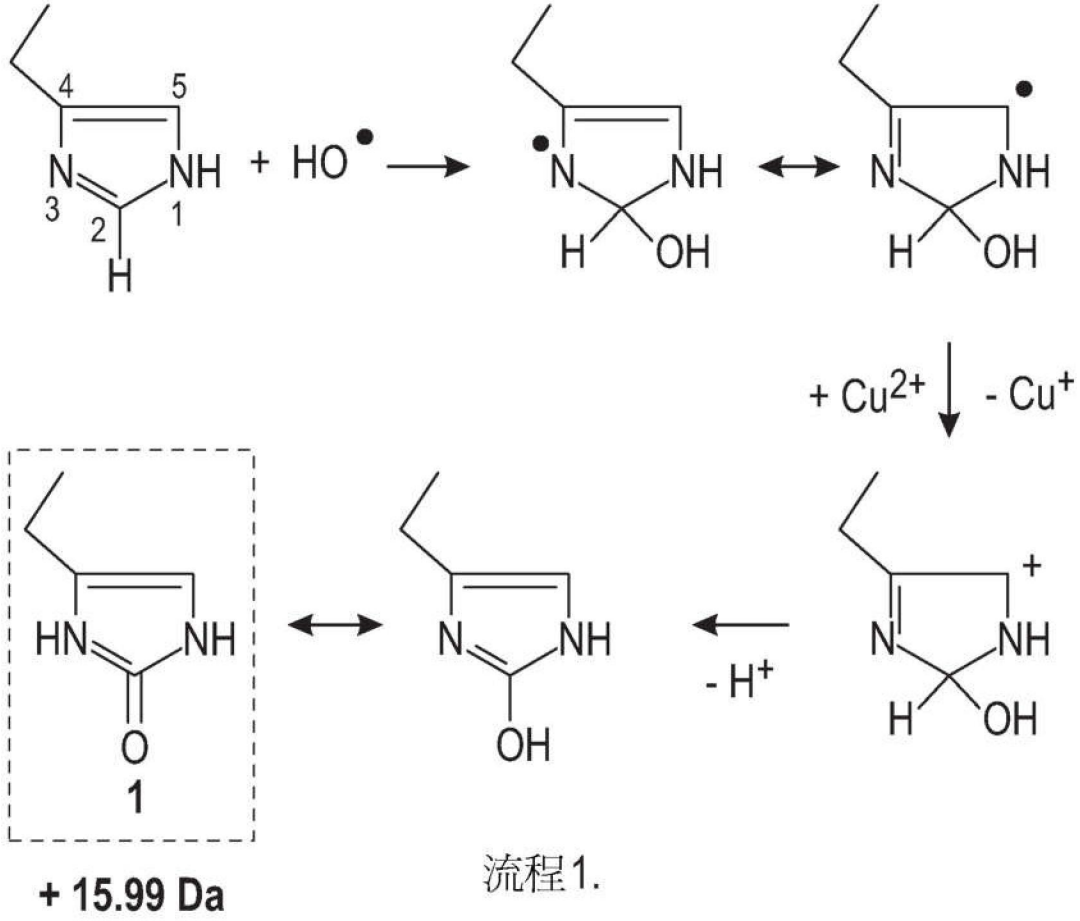
【發明圖式】


VEGFR1
VEGFR2
經Fabricator切割之mini Trap：來自阿柏西普的經Fabricator酶切割之產物
鉸鏈
VEGF R1
VEGF R2
VEGF R1
VEGF R2
胺基酸序列
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK
GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
DKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
鉸鏈域
片段
切下之Fc
片段

【圖1】

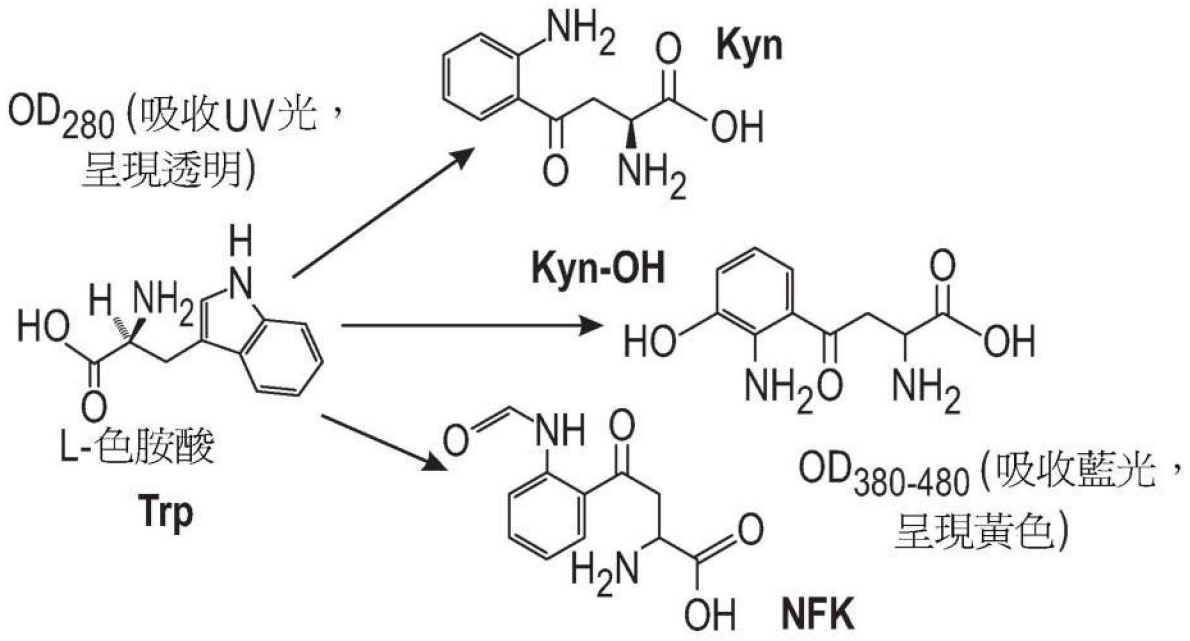

O2, hv
His
His-His 交聯
1O2
-H2O
內過氧化物
氫過氧化物
His
親核加成
2-側氧基-His
His+32
+13.98 Da

【圖 2】

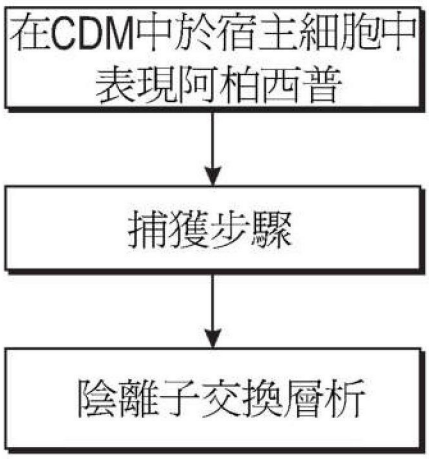

+ HO
+ Cu2+
- Cu+
- H+
1
+ 15.99 Da

流程1.

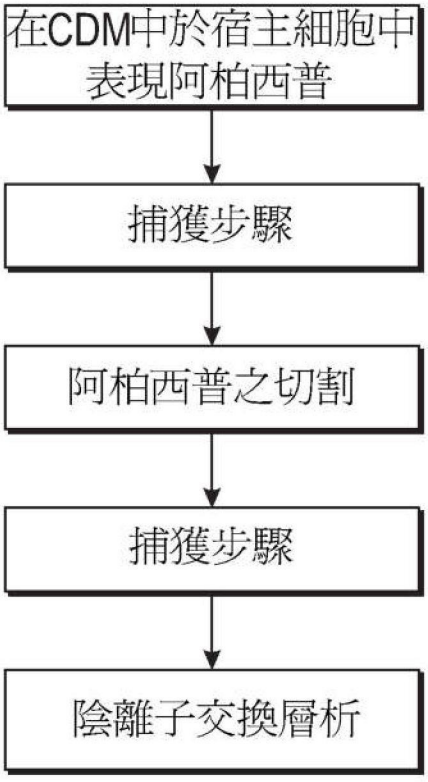
【圖 3】


OD280 (吸收UV光，
呈現透明)
Kyn
Kyn-OH
L-色胺酸
Trp
OD380-480 (吸收藍光，
呈現黃色)
NFK

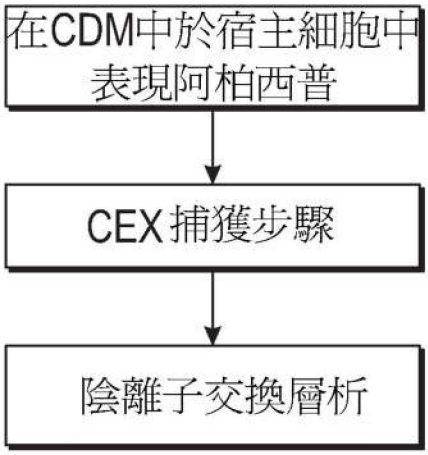
【圖 4】


在CDM中於宿主細胞中表現阿柏西普
捕獲步驟
陰離子交換層析

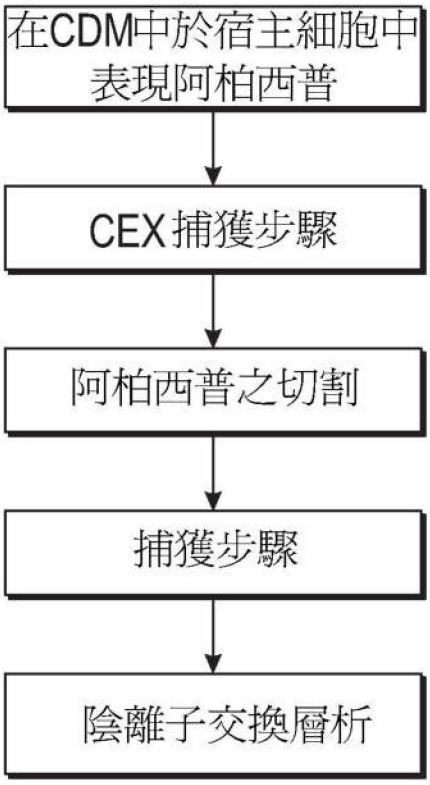
【圖 5】


在CDM中於宿主細胞中表現阿柏西普
捕獲步驟
阿柏西普之切割
捕獲步驟
陰離子交換層析

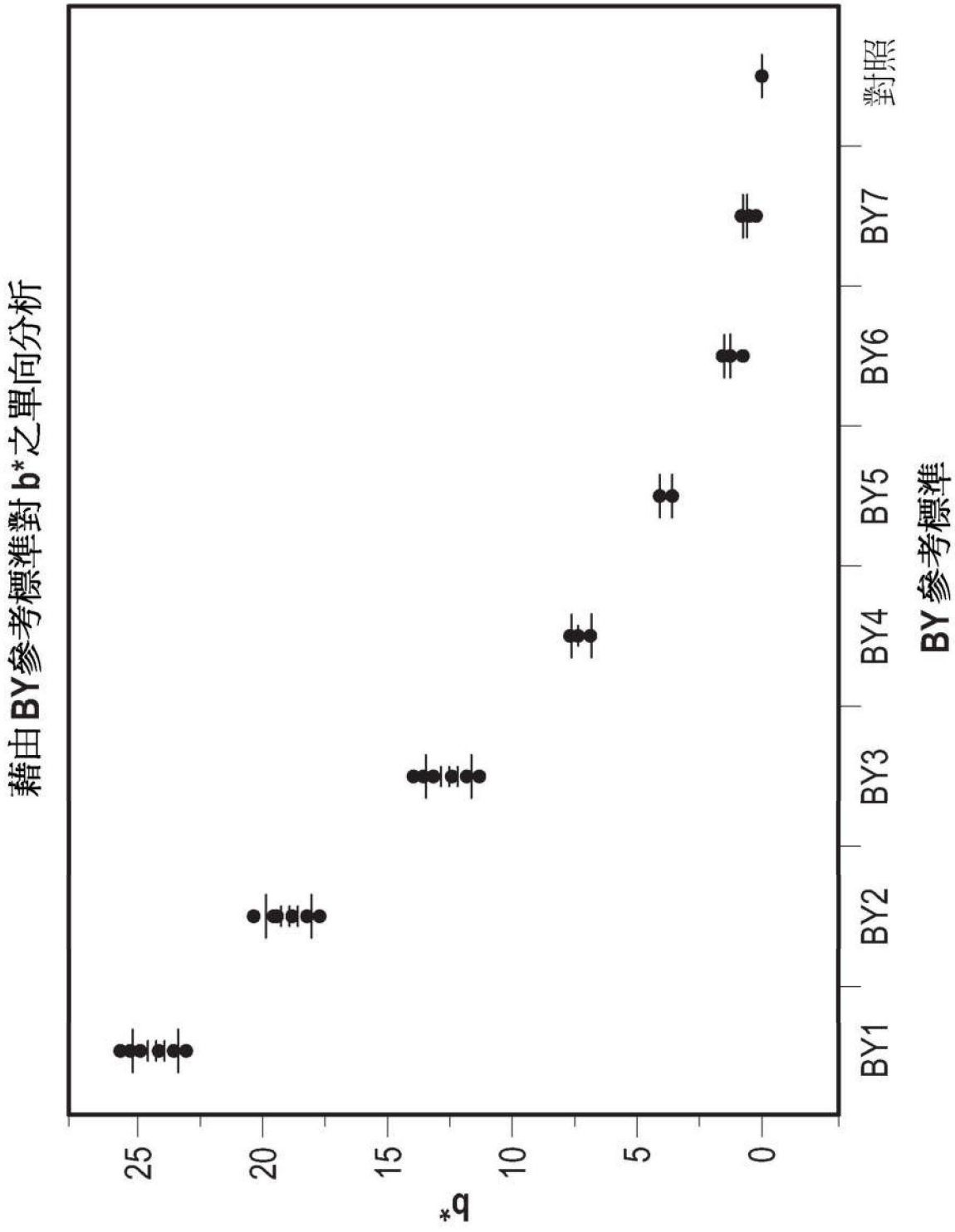
【圖 6】


在CDM中於宿主細胞中表現阿柏西普
CEX捕獲步驟
陰離子交換層析

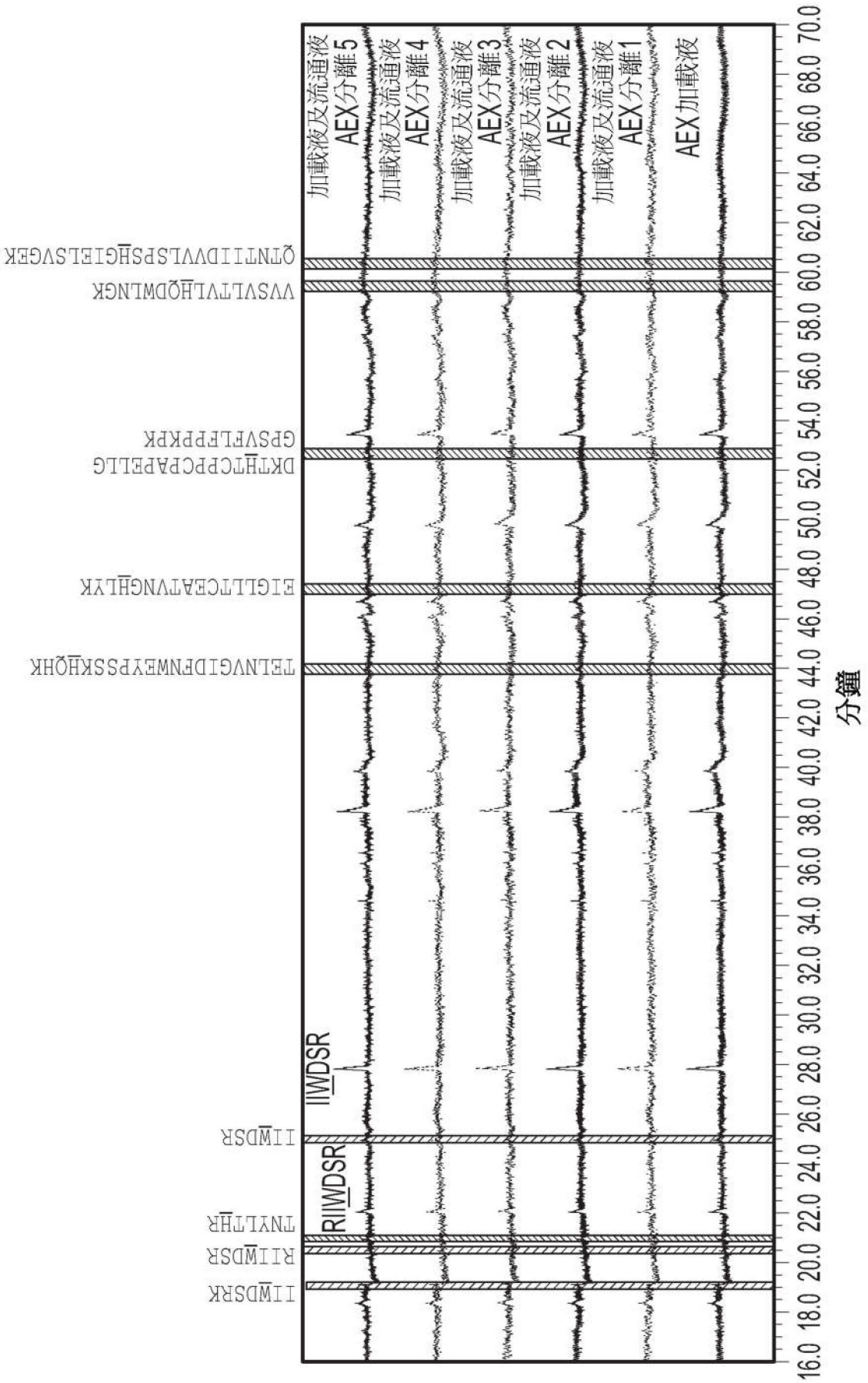
【圖 7】


在CDM中於宿主細胞中表現阿柏西普
CEX捕獲步驟
阿柏西普之切割
捕獲步驟
陰離子交換層析

【圖 8】


藉由BY參考標準對 b*之單向分析
b*
25
20
15
10
5
0
BY1
BY2
BY3
BY4
BY5
BY6
BY7
對照
BY 參考標準

【圖 9】

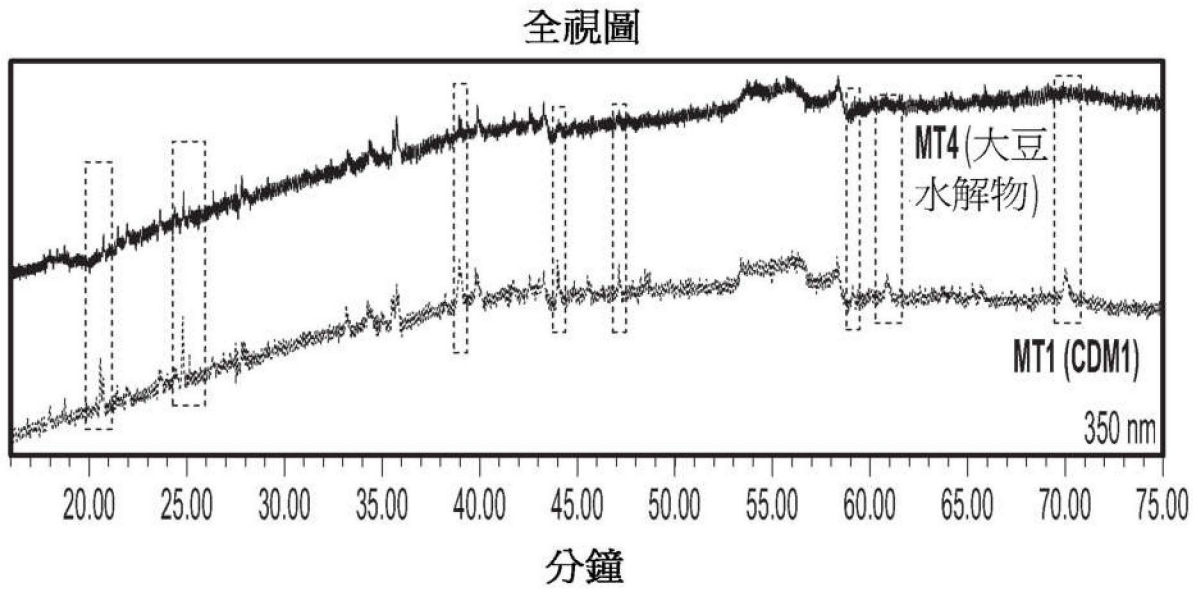

加載液及流通液
AEX分離5
加載液及流通液
AEX分離4
加載液及流通液
AEX分離3
加載液及流通液
AEX分離2
加載液及流通液
AEX分離1
AEX加載液
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK
VVSVLTVLHQDWLNGK
DKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPK
EIGLLTCEATVNGHLYK
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK
IIWDSR
IIWDSR
RIIWDSR
TNVLTHR
RIIWDSR
IIWDSRK
16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0 36.0 38.0 40.0 42.0 44.0 46.0 48.0 50.0 52.0 54.0 56.0 58.0 60.0 62.0 64.0 66.0 68.0 70.0
分鐘

【圖 10】

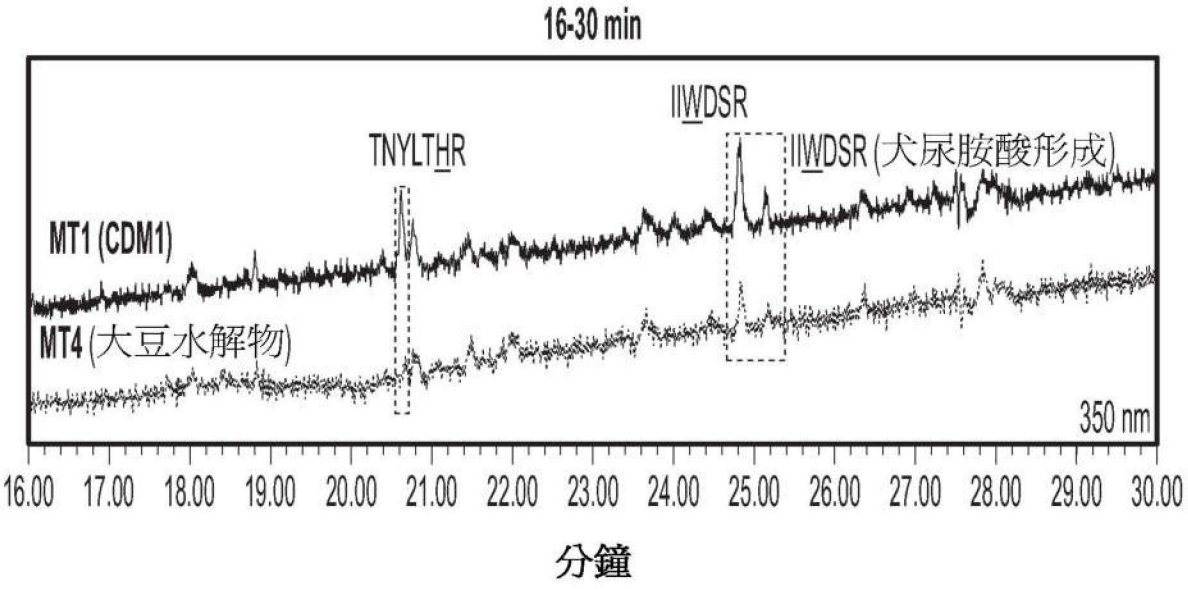
PTM	位點	胜肽序列	修飾	阿柏西普AEX加載液	阿柏西普AEX池				
					POROS 50 HQ pH 8.4 2.0 mS/cm AEX 分離 1	QsFF pH 8.0 2.5 mS/cm AEX 分離 2	POROS 50 HQ pH 8.0 2.5 mS/cm AEX 分離 3	QsFF pH 7.8 4.0 mS/cm AEX 分離 4	POROS 50 HQ pH 7.8 4.0 mS/cm AEX 分離 5
				3.06	1.05	0.96	1.33	1.35	1.55
His 氧化	H19	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR	+14	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
	H86	EIGLLTC*EATVNGHLYK	+14	0.013%	0.006%	0.007%	0.008%	0.009%	0.010%
	H95	TNYLTHR	+14	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
	H110	QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK	+14	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
	H145	TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK	+14	0.067%	0.039%	0.033%	0.035%	0.038%	0.042%
	H209	THTC*PPC*PAPELLGGPSVFLFPPKPK	+14	0.056%	0.027%	0.037%	0.040%	0.045%	0.040%
	H295	VVSVLTVLHQDWLNGK	+14	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Trp 氧化	W58	IIWDSR	+4	0.012%	0.008%	0.007%	0.009%	0.009%	0.011%
			+16	0.027%	0.017	0.022%	0.021%	0.021%	0.023%
			+32	0.114%	0.102%	0.111%	0.121%	0.114%	0.135%
			+48	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
	W138	TELNVGIDFNWEYPSSK	+4	0.069%	0.055%	0.040%	0.036	0.039%	0.038%
			+16	0.131%	0.078%	0.070%	0.089	0.077%	0.081%
			+32	0.086%	0.057%	0.040%	0.059%	0.046%	0.068%

*：烷化半胱胺酸

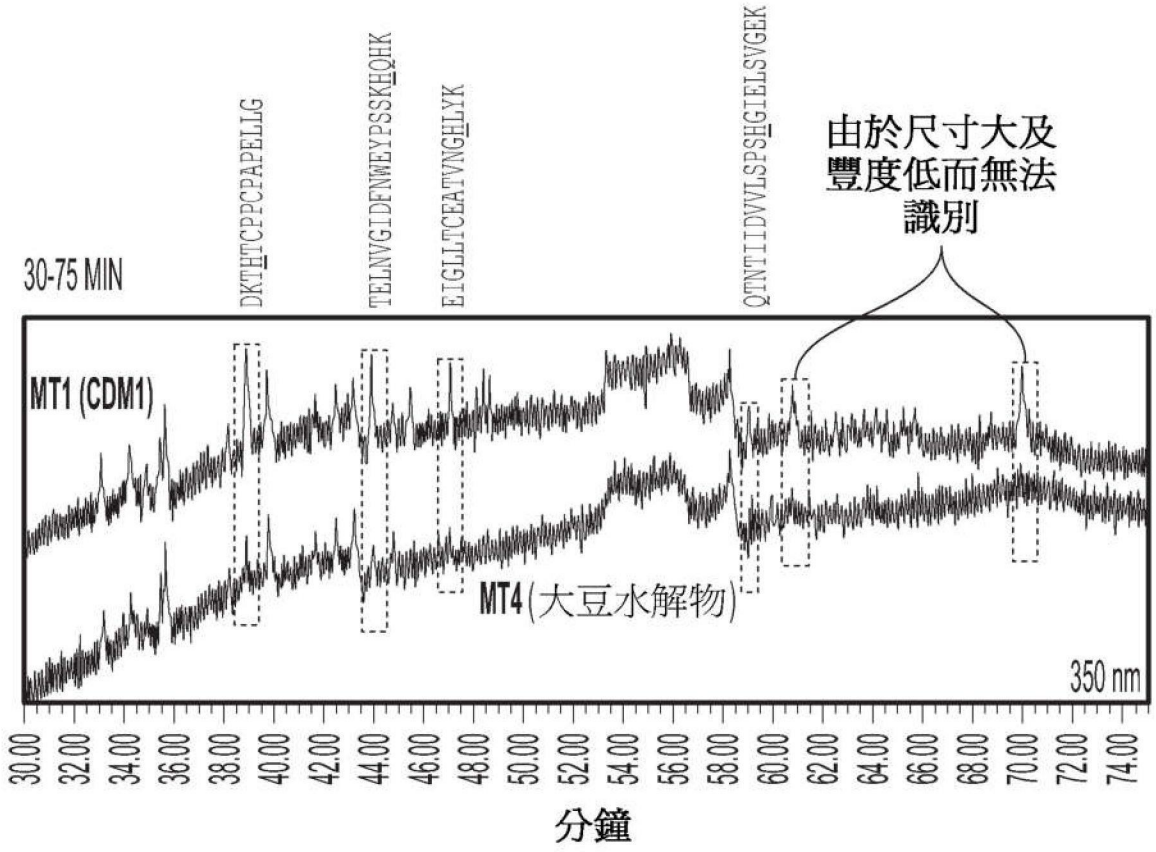
【圖11】


全視圖
MT4 (大豆
水解物)
MT1 (CDM1)
350 nm
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
65.00
70.00
75.00
分鐘

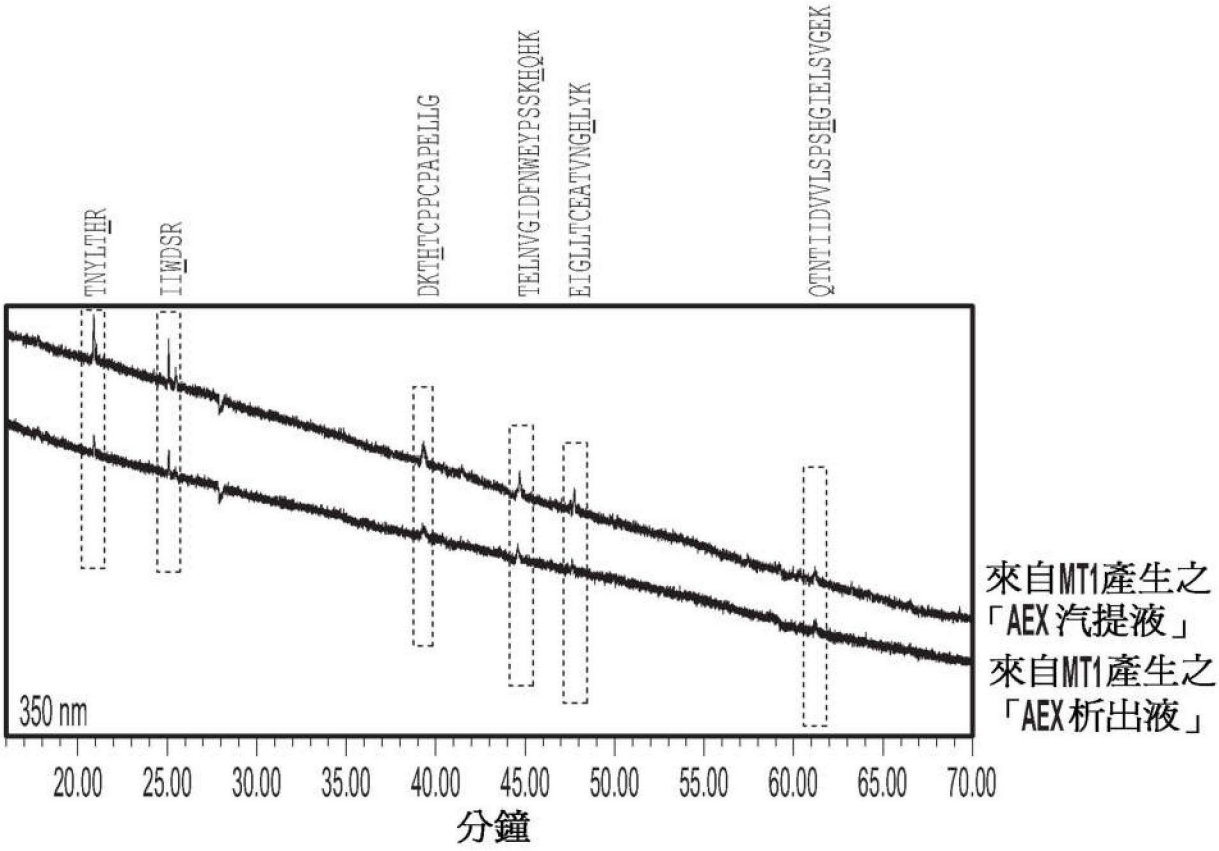
【圖 12A】


16-30 min
IIWDSR
TNYLTHR
IIWDSR (犬尿胺酸形成)
MT1 (CDM1)
MT4 (大豆水解物)
350 nm
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
23.00
24.00
25.00
26.00
27.00
28.00
29.00
30.00
分鐘

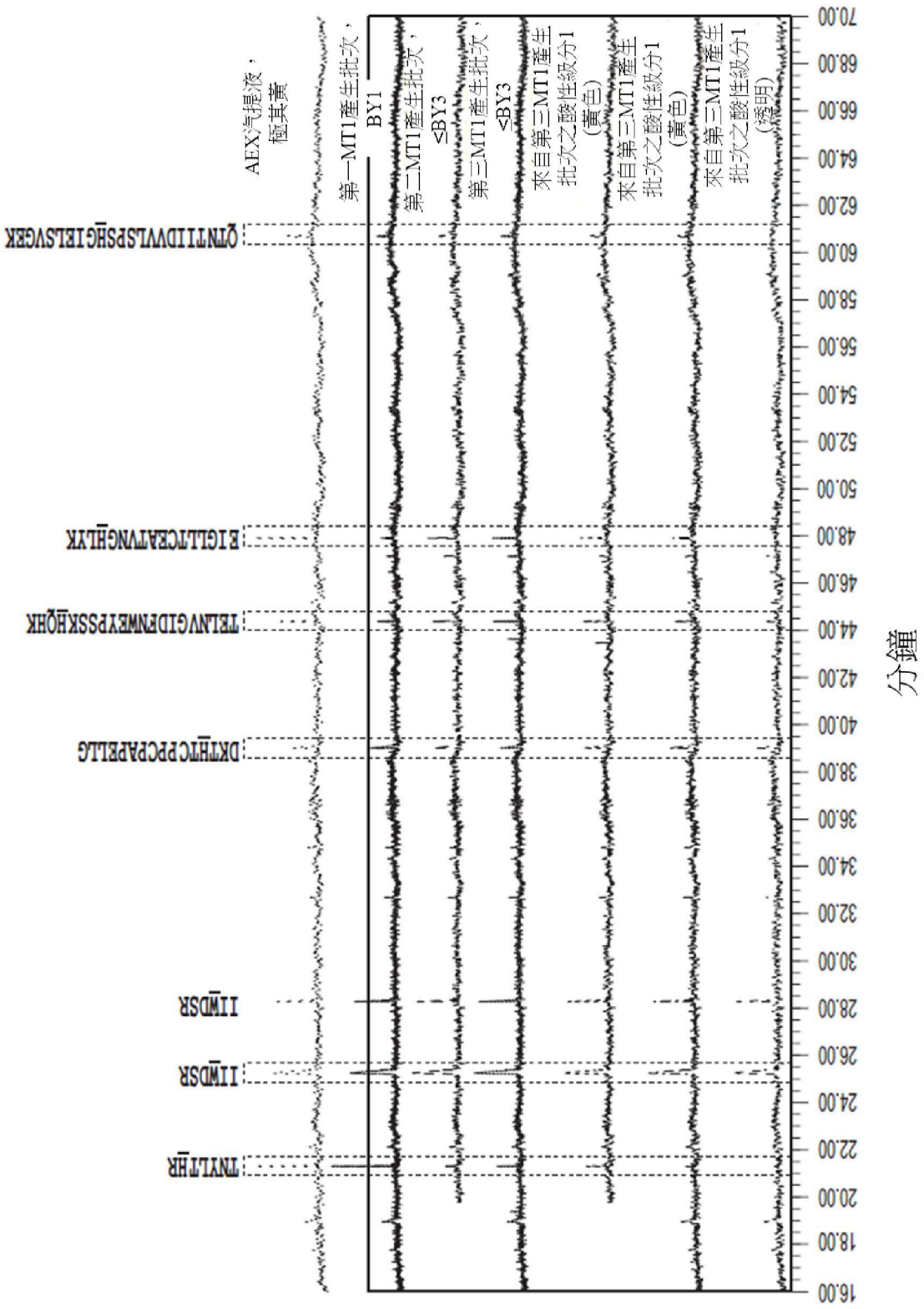
【圖 12B】


30-75 MIN
DKTHTCPPCPAPELLG
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK
EIGLLTCEATVNGHLYK
QTNTIDVVLSPSHGIELSVGEK
由於尺寸大及
豐度低而無法
識別
MT1 (CDM1)
MT4 (大豆水解物)
350 nm
30.00
32.00
34.00
36.00
38.00
40.00
42.00
44.00
46.00
48.00
50.00
52.00
54.00
56.00
58.00
60.00
62.00
64.00
66.00
68.00
70.00
72.00
74.00
分鐘

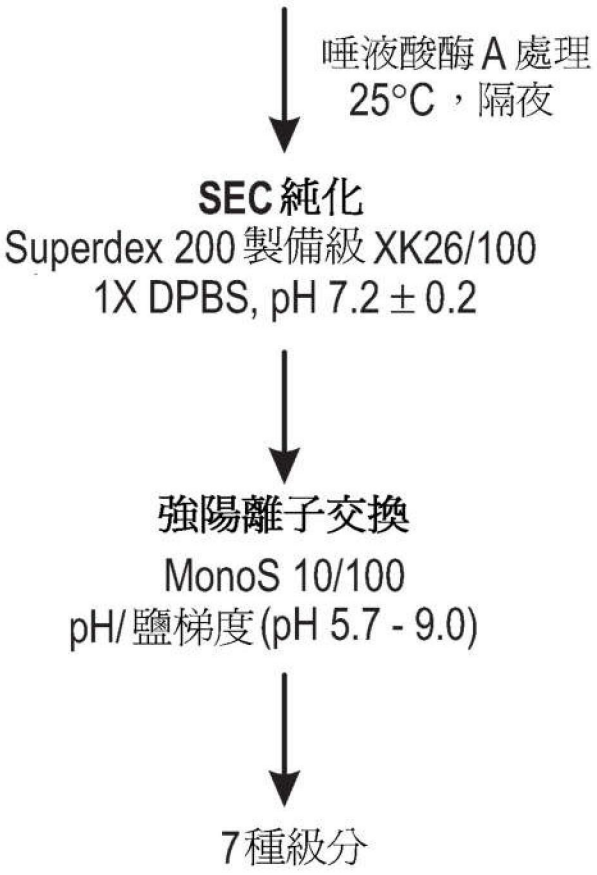
【圖 12C】


TNYLTHR
LIWDSR
DKTHTCPPCPAPELLG
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK
EIGLLTCEATVNGHLYK
QTNTIDVVLSPSHGIELSVGEK
來自MT1產生之
「AEX汽提液」
來自MT1產生之
「AEX析出液」
350 nm
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
65.00
70.00
分鐘

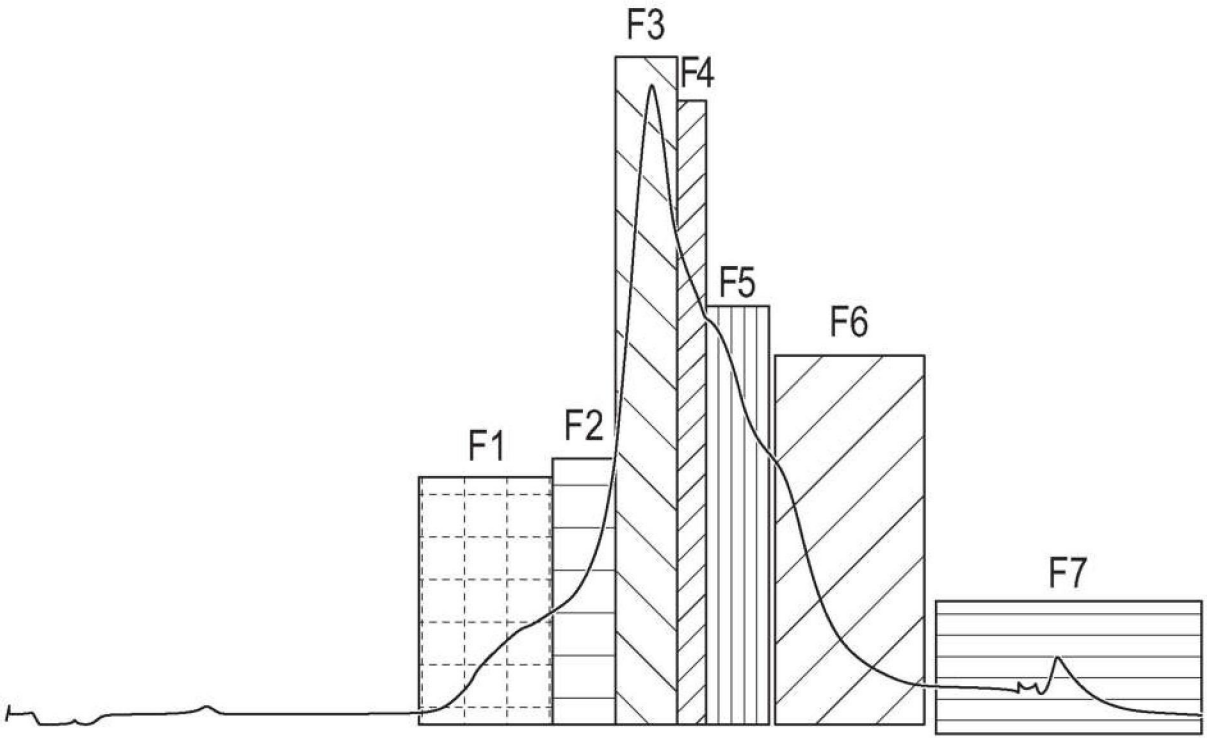
【圖 13】


AEX汽提液，
極其黃
第一MT1產生批次，
BY1
第二MT1產生批次，
≤BY3
第三MT1產生批次，
<BY3
來自第三MT1產生
批次之酸性級分1
(黃色)
來自第三MT1產生
批次之酸性級分1
(黃色)
來自第三MT1產生
批次之酸性級分1
(透明)
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK
EIGLLICEATVNGHLYK
TEILNVGIDFNWEYPSSKHQHK
DKTHTCPPCPAPELLG
IIWDSR
IIWDSR
TNVLTHR
70.00
68.00
66.00
64.00
62.00
60.00
58.00
56.00
54.00
52.00
50.00
48.00
46.00
44.00
42.00
40.00
38.00
36.00
34.00
32.00
30.00
28.00
26.00
24.00
22.00
20.00
18.00
16.00
分鐘

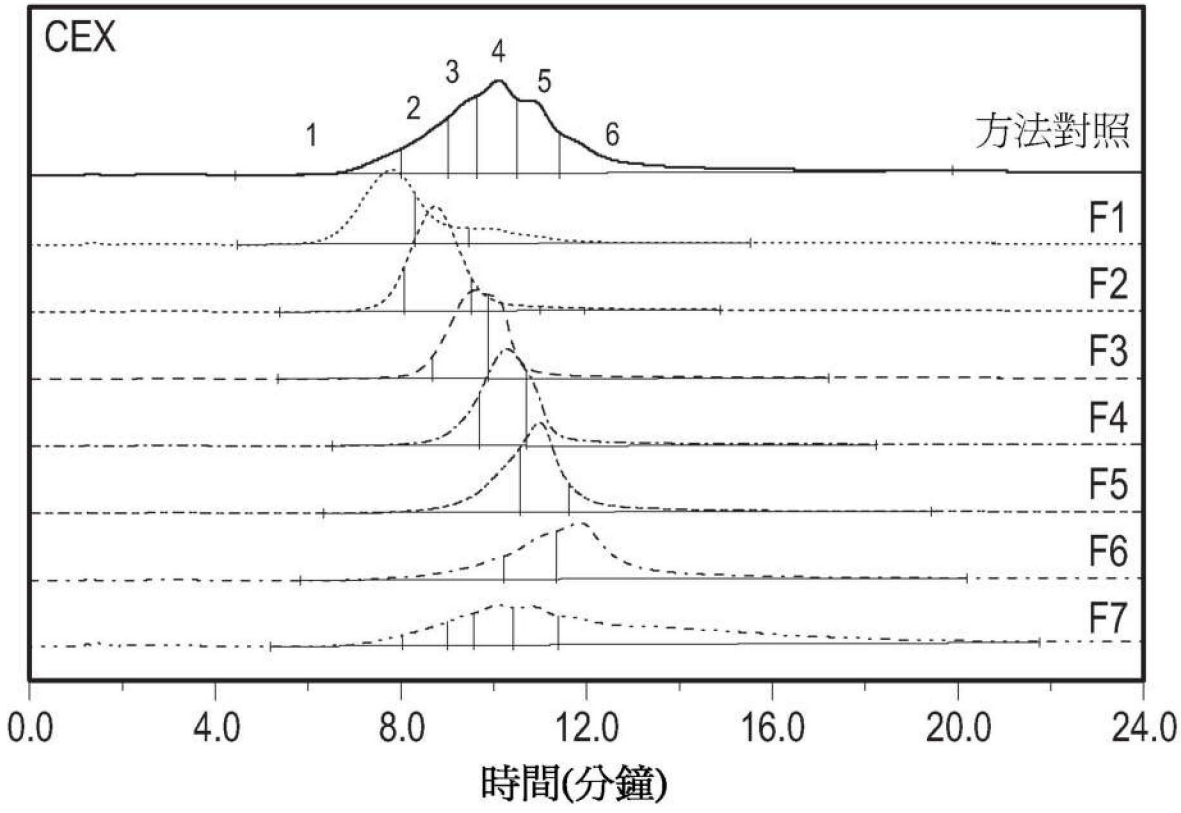
【圖14】


唾液酸酶 A 處理
25°C，隔夜
SEC 純化
Superdex 200 製備級 XK26/100
1X DPBS, pH 7.2 ± 0.2
強陽離子交換
MonoS 10/100
pH/鹽梯度 (pH 5.7 - 9.0)
7種級分

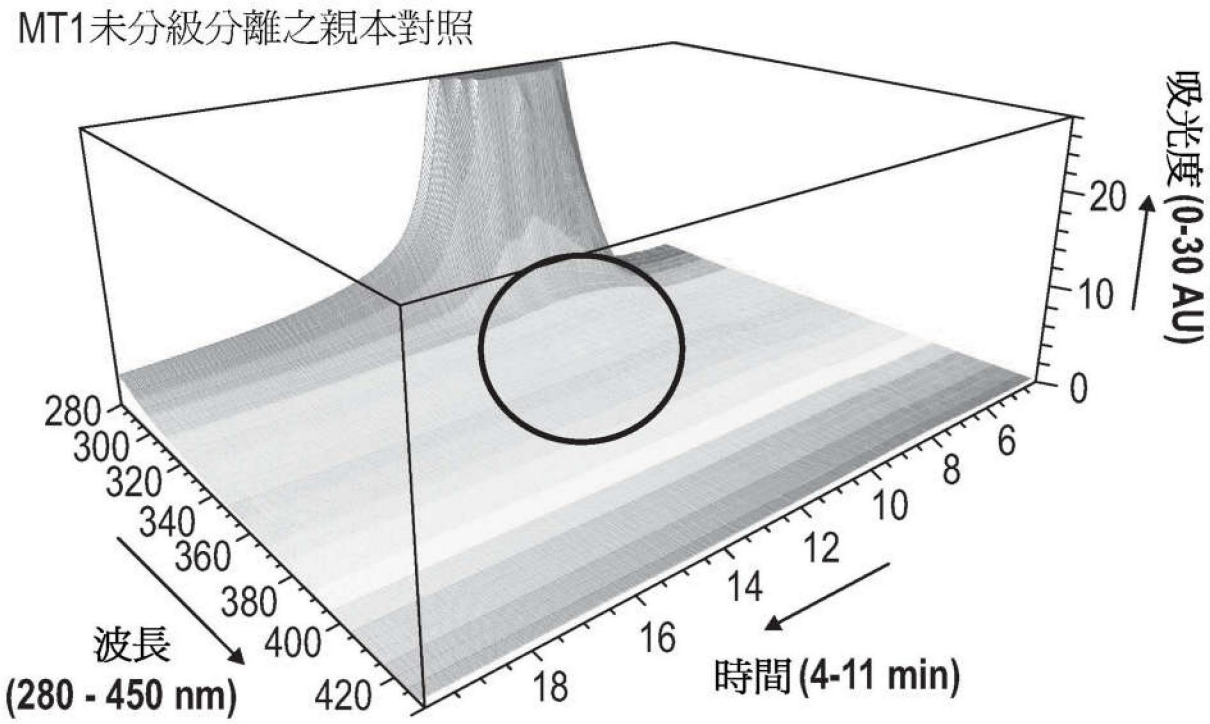
【圖 15】


F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7

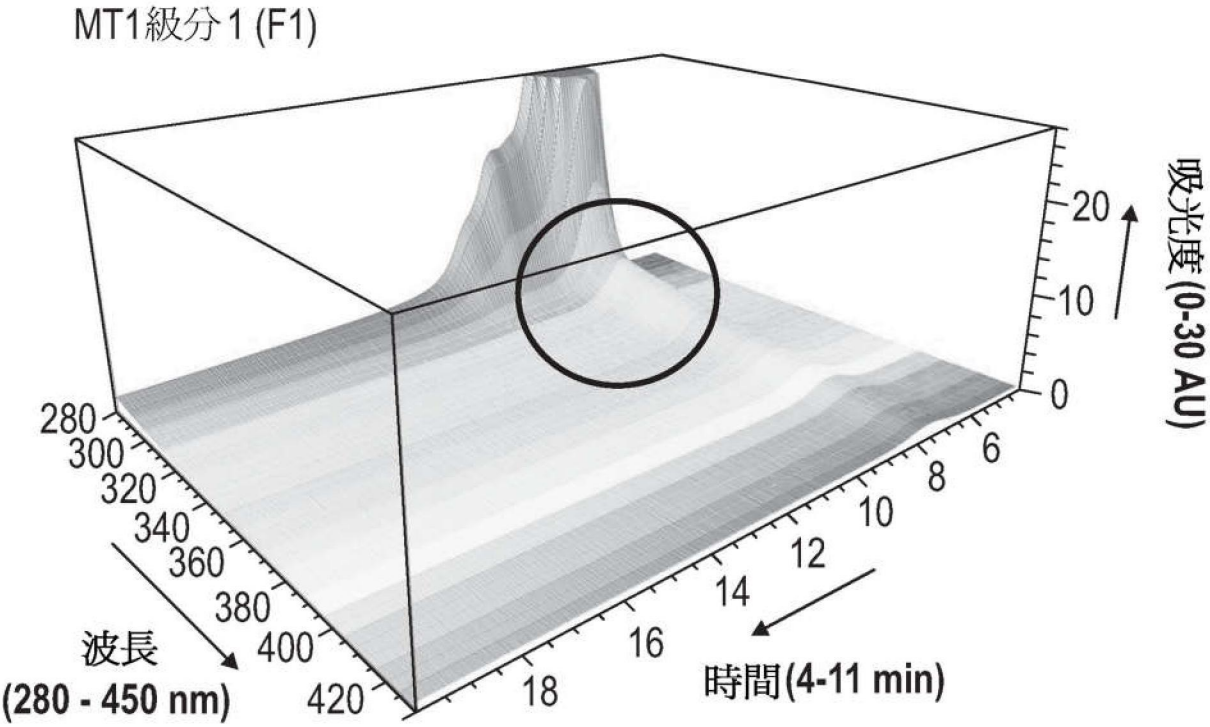
【圖 16】



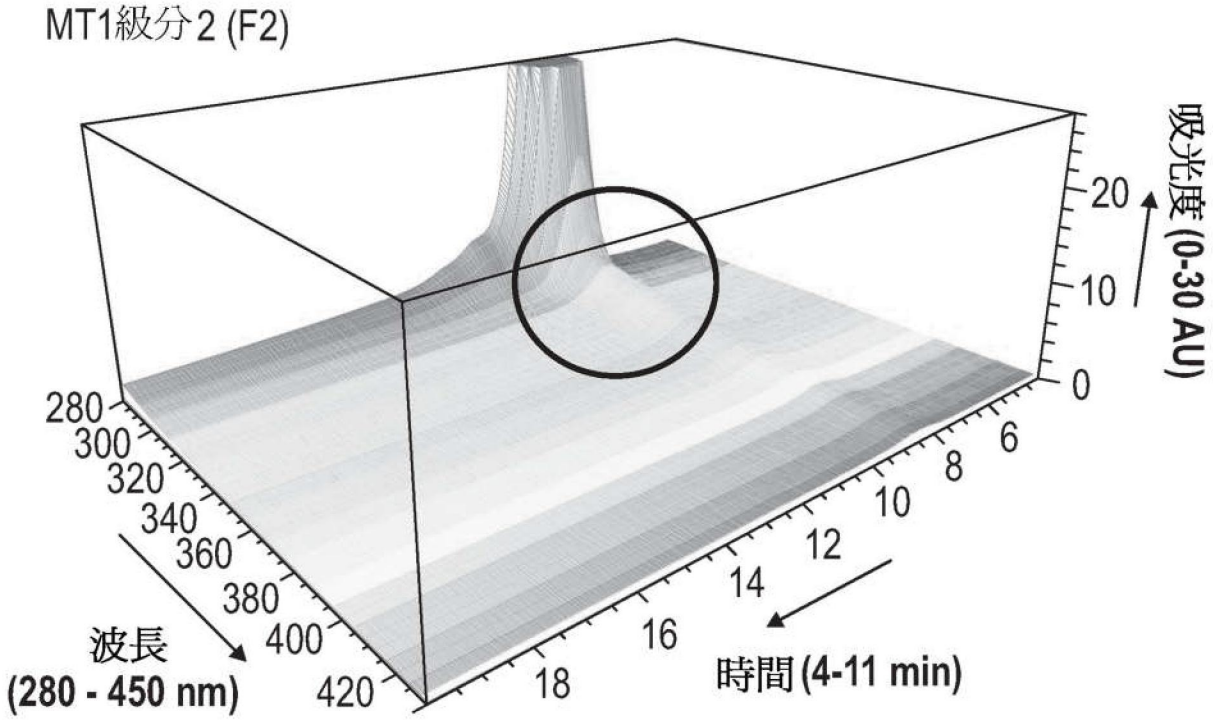
【圖 17】


MT1未分級分離之親本對照
吸光度(0-30 AU)
20
10
0
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
6
8
10
12
14
16
18
時間(4-11 min)

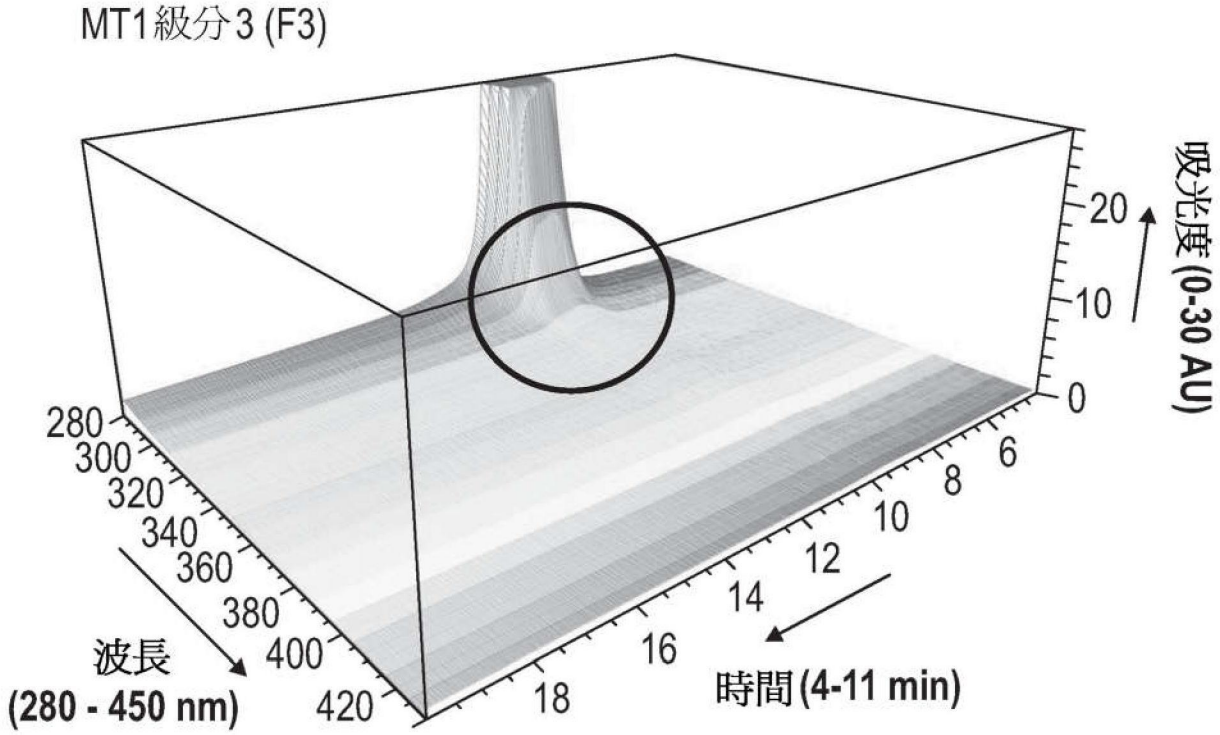
【圖 18A】


MT1級分1 (F1)
吸光度(0-30 AU)
20
10
0
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
6
8
10
12
14
16
18
時間(4-11 min)

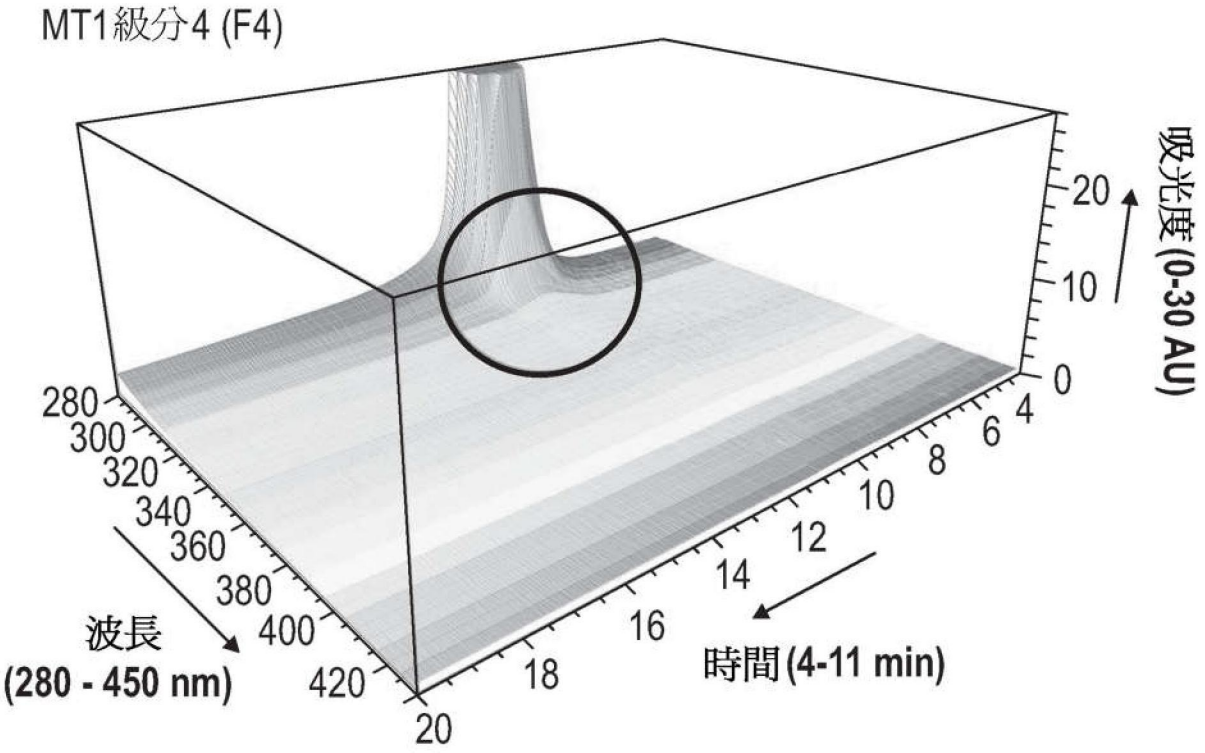
【圖 18B】


MT1級分2 (F2)
吸光度 (0-30 AU)
20
10
0
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
6
8
10
12
14
16
18
時間 (4-11 min)

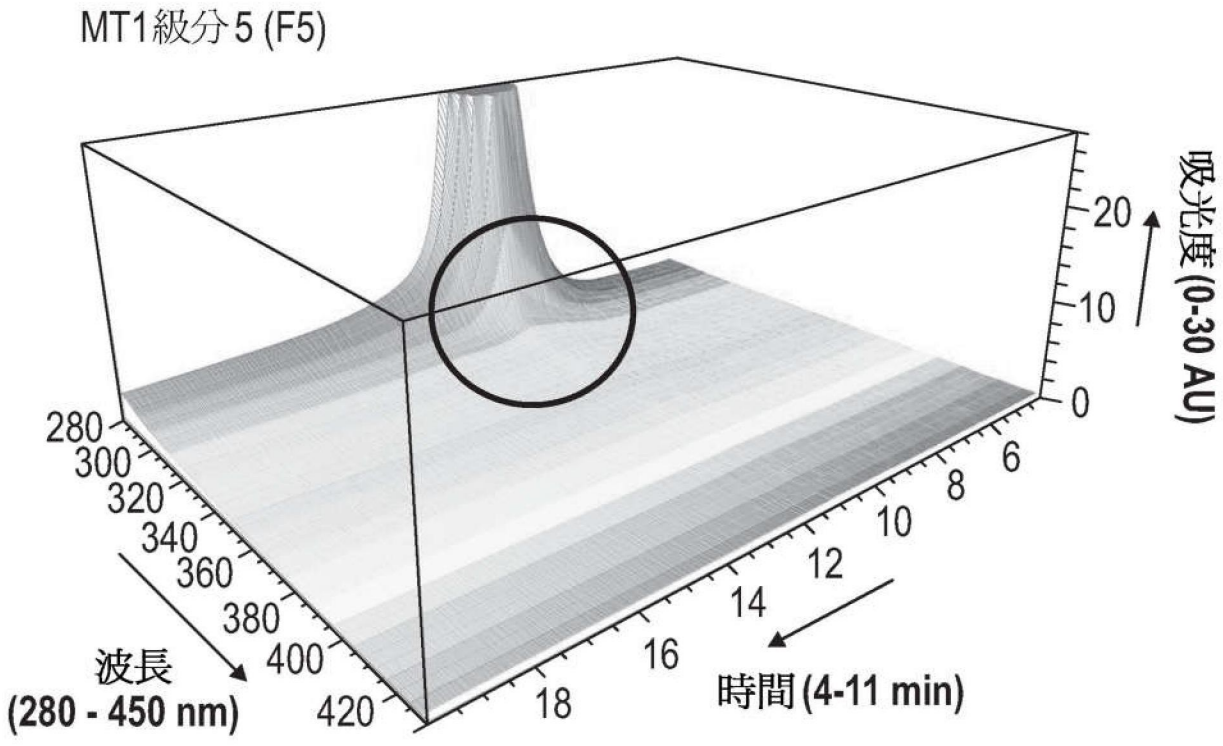
【圖 18C】


MT1級分3 (F3)
吸光度 (0-30 AU)
20
10
0
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
6
8
10
12
14
16
18
時間 (4-11 min)

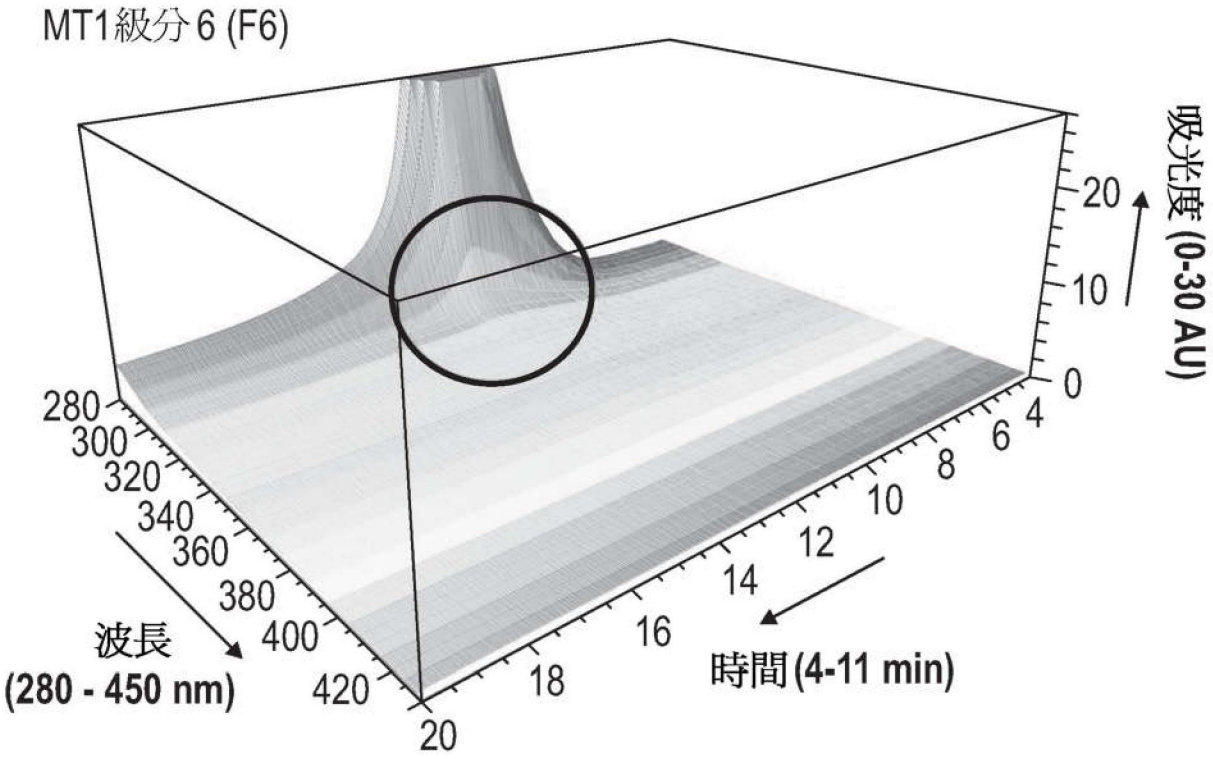
【圖 18D】


MT1級分4 (F4)
吸光度 (0-30 AU)
0
10
20
4
6
8
10
12
14
16
18
20
時間 (4-11 min)
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)

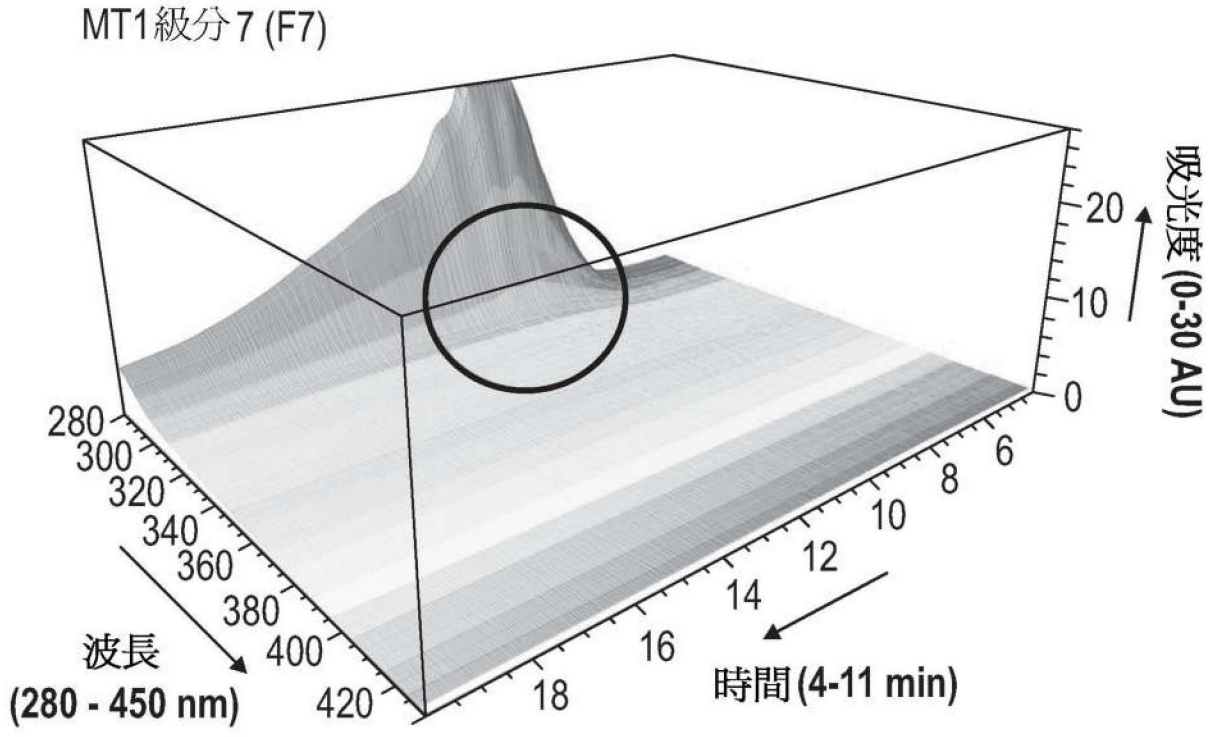
【圖 18E】


MT1級分5 (F5)
吸光度 (0-30 AU)
0
10
20
6
8
10
12
14
16
18
時間 (4-11 min)
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)

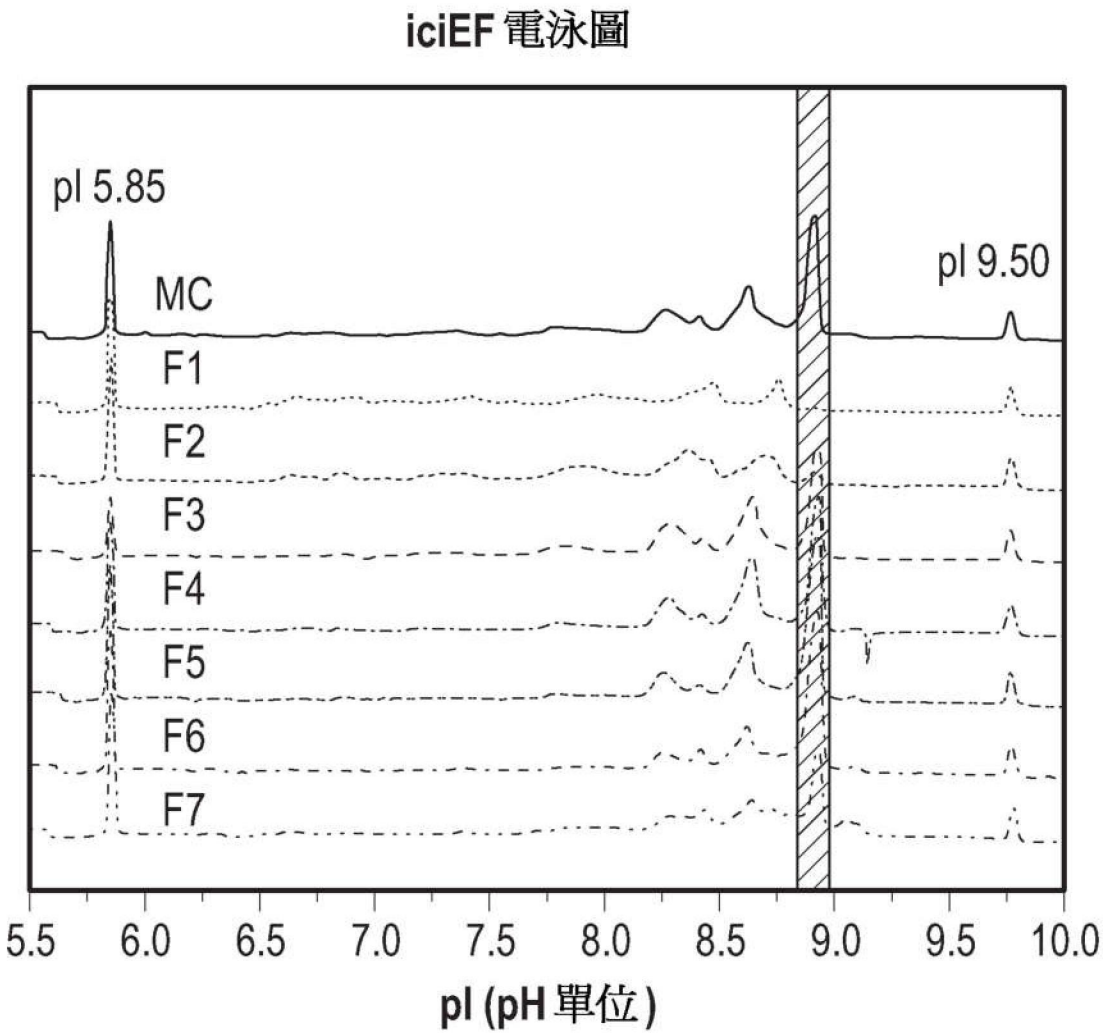
【圖 18F】


MT1級分 6 (F6)
吸光度 (0-30 AU)
0
10
20
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
4
6
8
10
12
14
16
18
20
時間 (4-11 min)

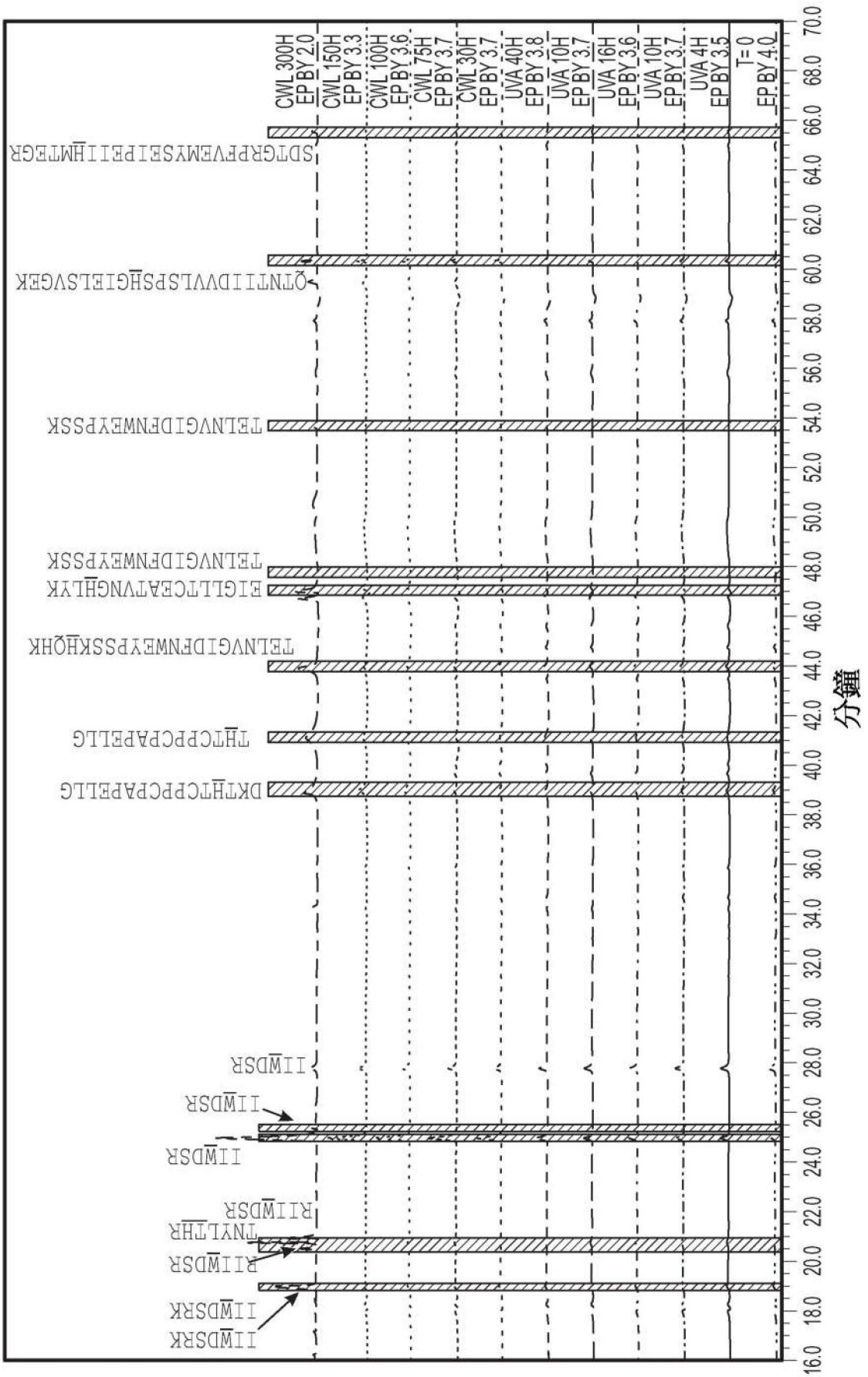
【圖 18G】


MT1級分 7 (F7)
吸光度 (0-30 AU)
0
10
20
280
300
320
340
360
380
400
420
波長
(280 - 450 nm)
6
8
10
12
14
16
18
時間 (4-11 min)

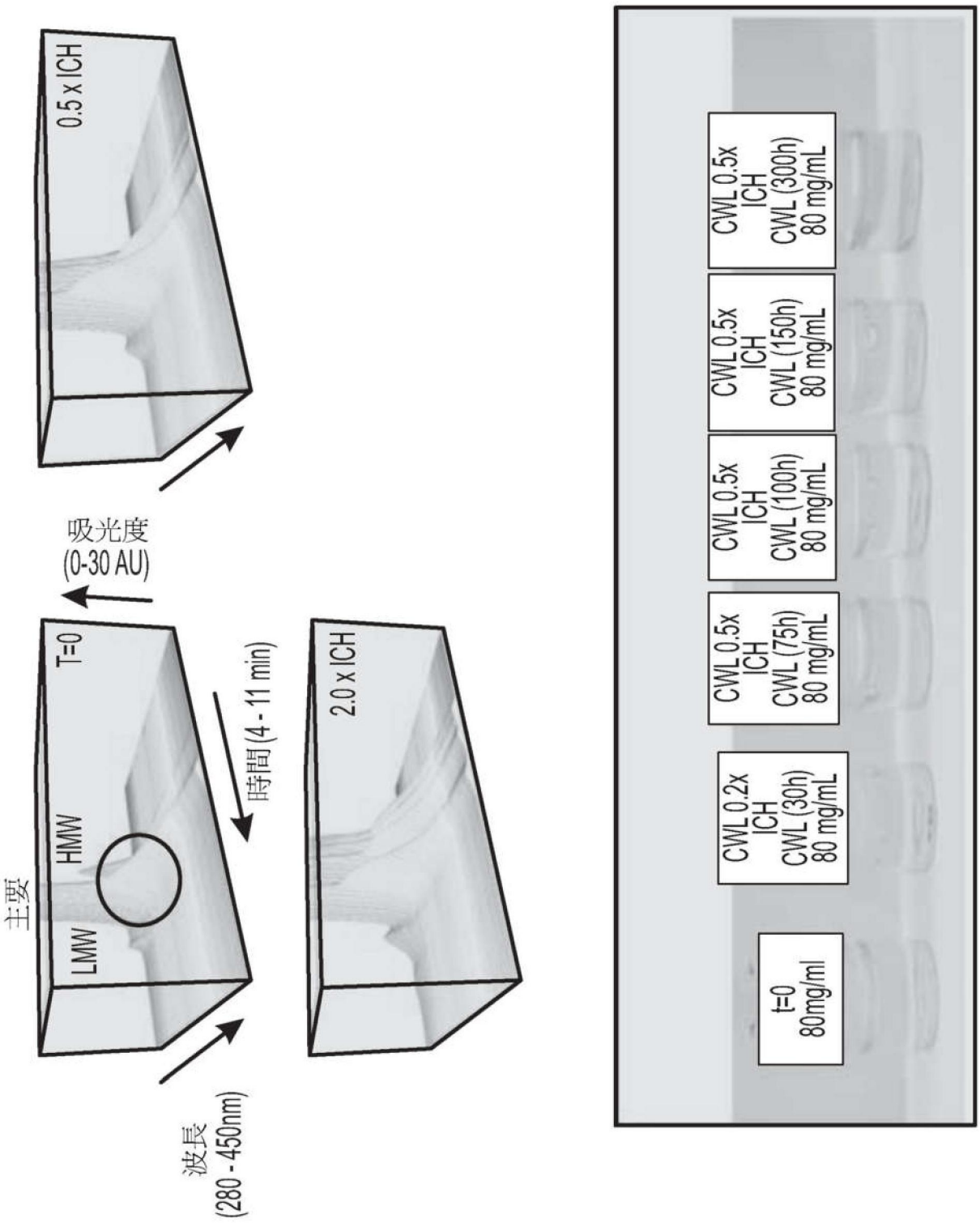
【圖 18H】


iciEF 電泳圖
pI 5.85
pI 9.50
MC
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
pI (pH 單位)

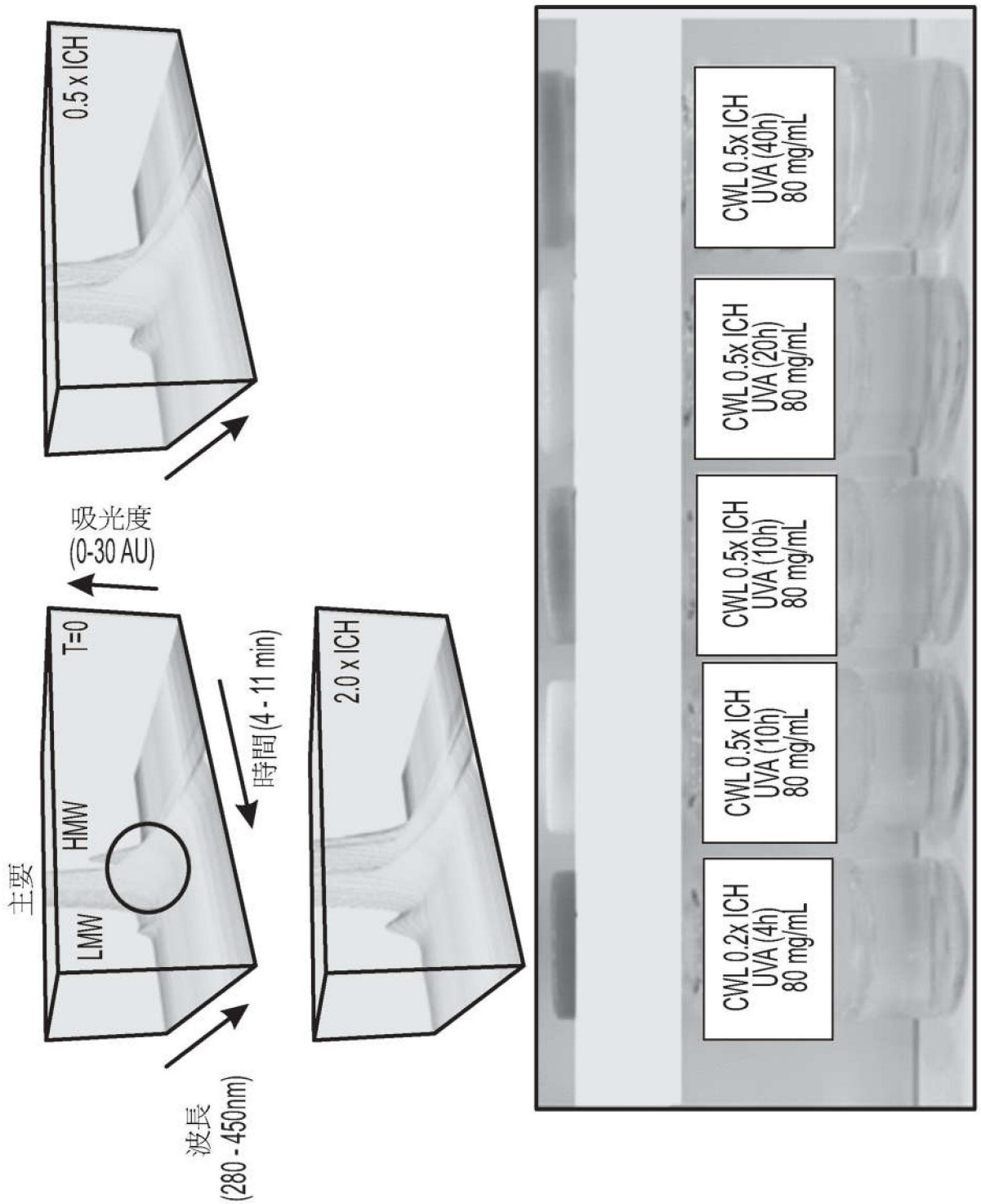
【圖 19】


CWL 300H EP BY 2.0
CWL 150H EP BY 3.3
CWL 100H EP BY 3.6
CWL 75H EP BY 3.7
CWL 30H EP BY 3.7
UVA 40H EP BY 3.8
UVA 10H EP BY 3.7
UVA 16H EP BY 3.6
UVA 10H EP BY 3.7
UVA 4H EP BY 3.5
T=0 EP BY 4.0
70.0
68.0
66.0
64.0
62.0
60.0
58.0
56.0
54.0
52.0
50.0
48.0
46.0
44.0
42.0
40.0
38.0
36.0
34.0
32.0
30.0
28.0
26.0
24.0
22.0
20.0
18.0
16.0
分鐘

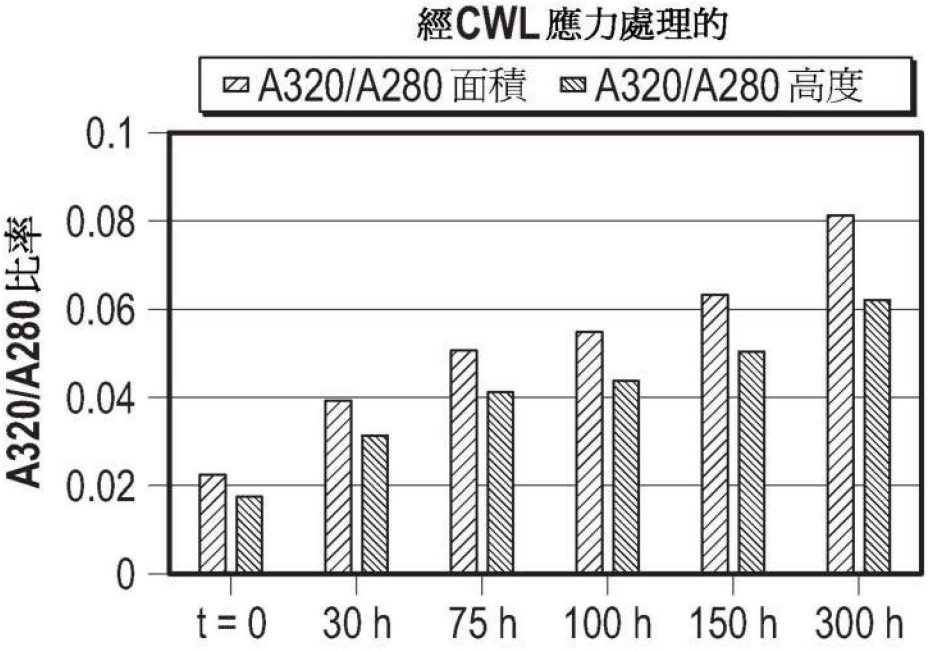
【圖 20】


0.5 x ICH
吸光度
(0-30 AU)
T=0
HMW
LMW
主要
時間 (4 - 11 min)
2.0 x ICH
波長
(280 - 450nm)
t=0
80mg/ml
CWL 0.2x
ICH
CWL (30h)
80 mg/mL
CWL 0.5x
ICH
CWL (75h)
80 mg/mL
CWL 0.5x
ICH
CWL (100h)
80 mg/mL
CWL 0.5x
ICH
CWL (150h)
80 mg/mL
CWL 0.5x
ICH
CWL (300h)
80 mg/mL

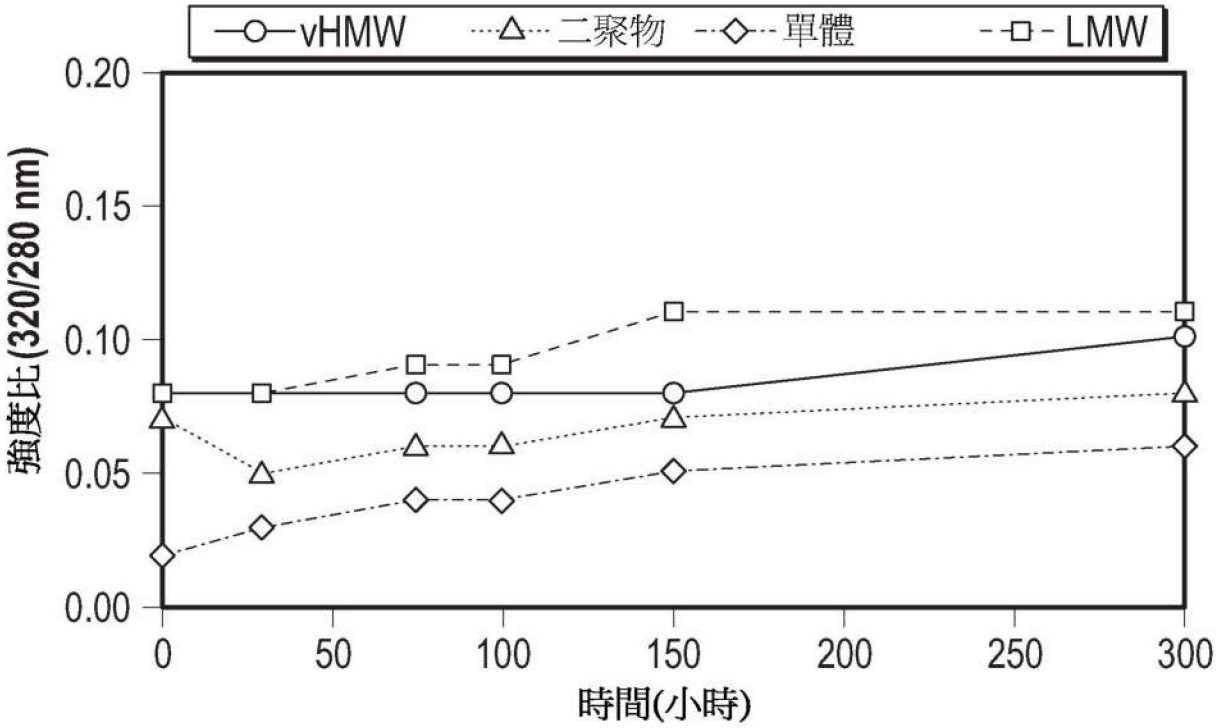
【圖 21】


0.5 x ICH
吸光度
(0-30 AU)
T=0
HMW
LMW
主要
時間(4 - 11 min)
2.0 x ICH
波長
(280 - 450nm)
CWL 0.2x ICH
UVA (4h)
80 mg/mL
CWL 0.5x ICH
UVA (10h)
80 mg/mL
CWL 0.5x ICH
UVA (10h)
80 mg/mL
CWL 0.5x ICH
UVA (20h)
80 mg/mL
CWL 0.5x ICH
UVA (40h)
80 mg/mL

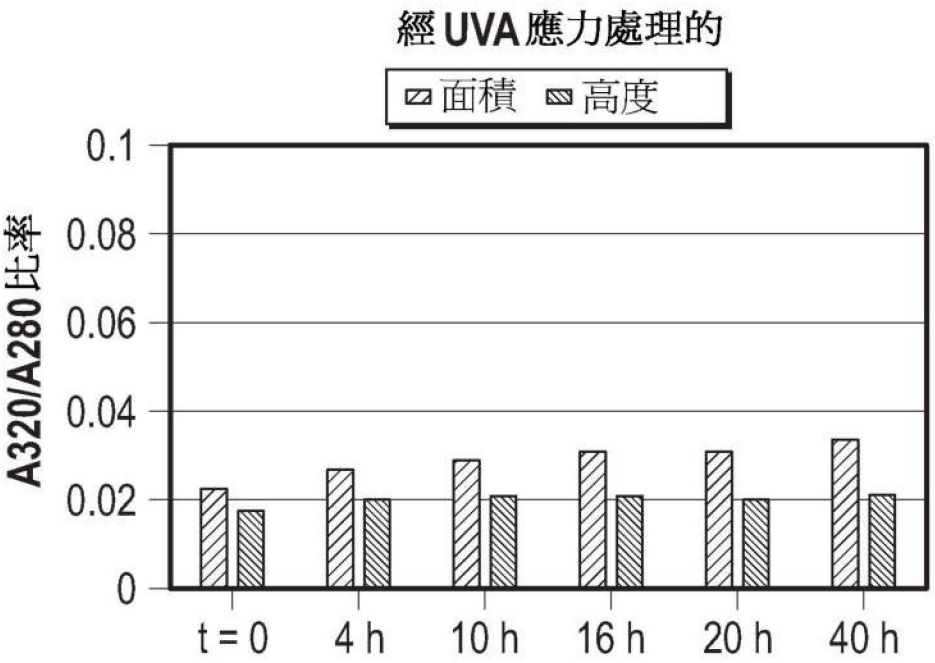
【圖 22】


經CWL應力處理的
A320/A280 面積
A320/A280 高度
A320/A280比率
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
t = 0
30 h
75 h
100 h
150 h
300 h

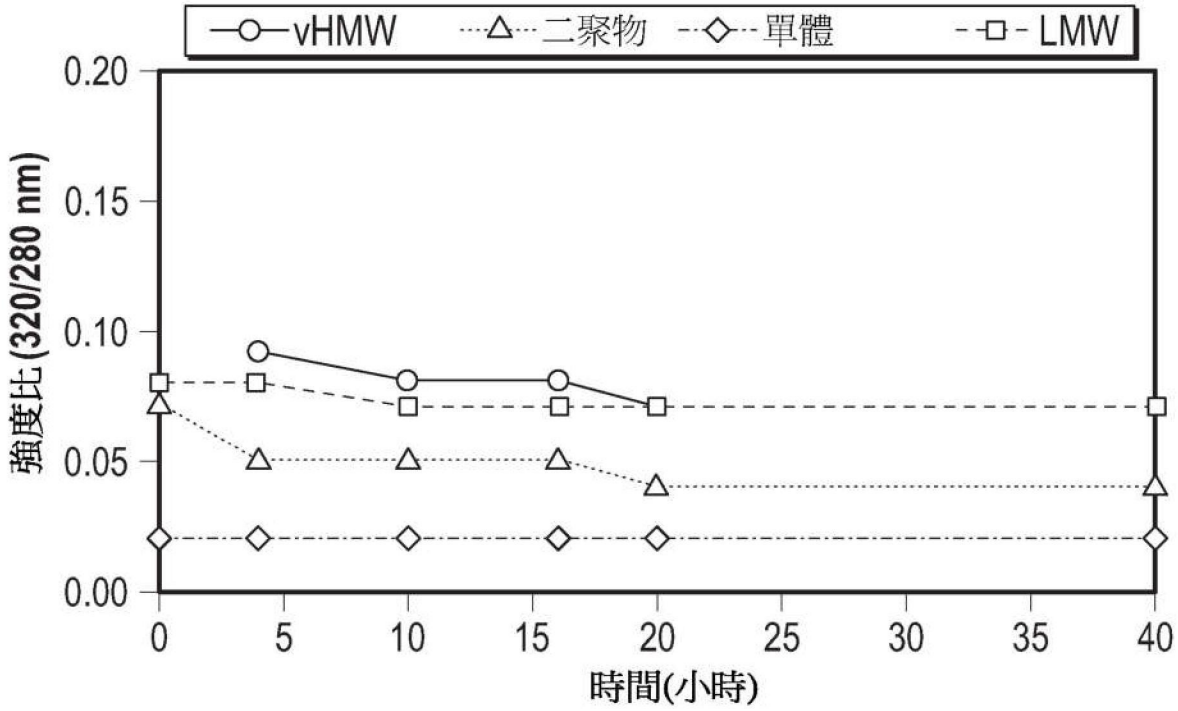
【圖 23A】


vHMW
二聚物
單體
LMW
強度比(320/280 nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
50
100
150
200
250
300
時間(小時)

【圖 23B】


經UVA應力處理的
面積
高度
A320/A280比率
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
t = 0
4 h
10 h
16 h
20 h
40 h

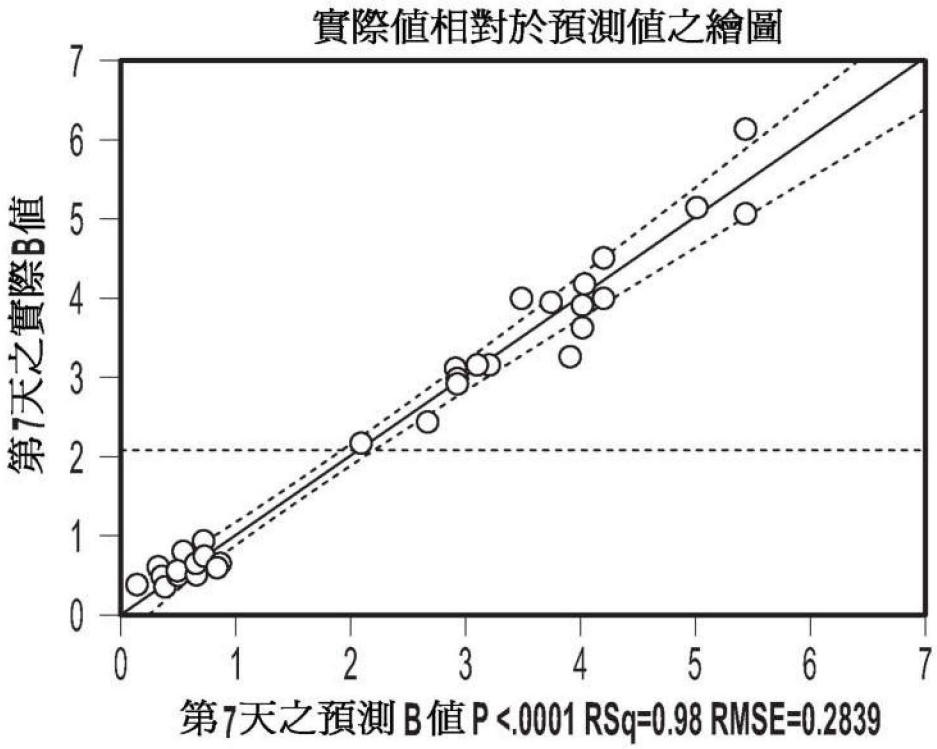
【圖 24A】


vHMW
二聚物
單體
LMW
強度比 (320/280 nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
時間(小時)

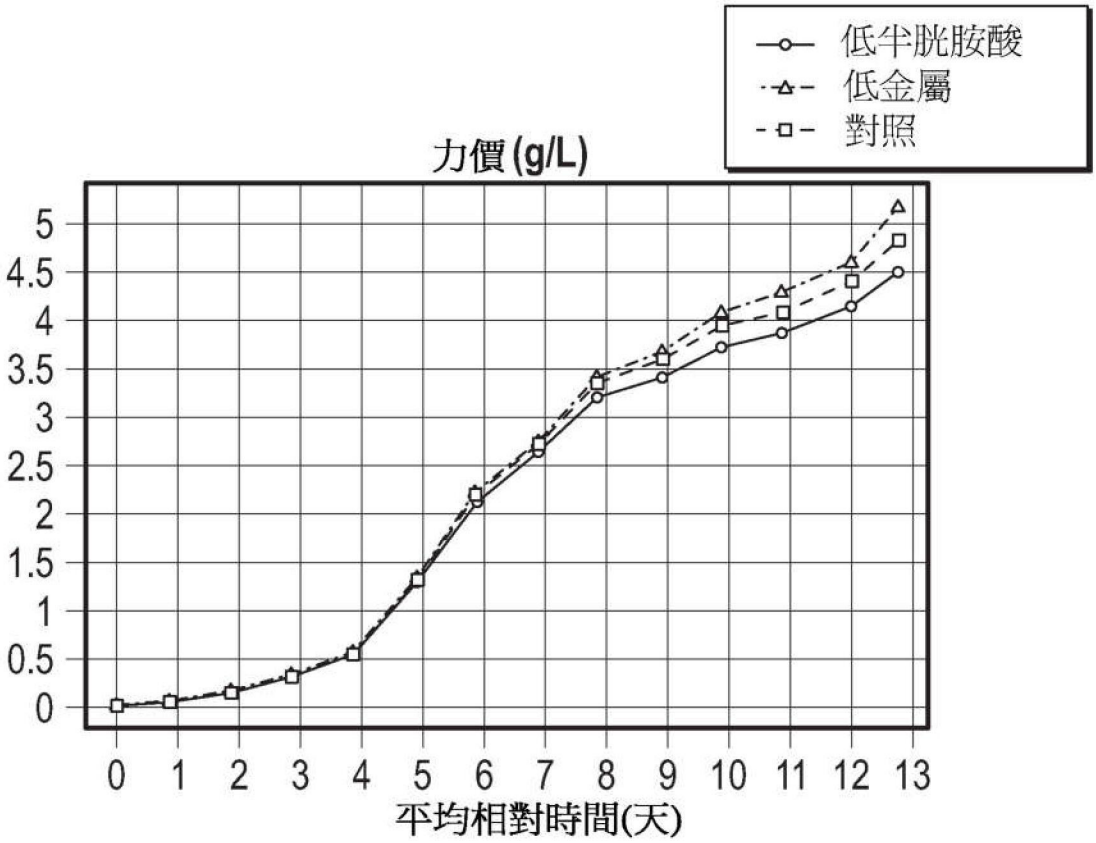
【圖 24B】

按比例估算值					
條項	按比例估算值	標準誤差	t比率	概率>|t|
截距	0.4682071	0.009776	47.89	<.0001*
半胱胺酸(0,1)	0.3470799	0.009806	35.40	<.0001*
B族維生素(0,1)	0.0373611	0.009897	3.78	0.0008*
鐵(0,1)	0.0698208	0.010074	6.93	<.0001*
鋅(0,1)	0.0538585	0.010255	5.25	<.0001*
葉酸(0,1)	0.037899	0.010172	3.73	0.0009*
半胱胺酸*B族維生素	0.0253685	0.009837	2.58	**0.0155***
半胱胺酸*鐵	0.07244	0.01011	7.17	<.0001*
半胱胺酸*鋅	0.0339284	0.009973	3.40	0.0020*
半胱胺酸*葉酸	0.0298402	0.010218	2.92	0.0068*
B族維生素*鐵	0.0229271	0.009945	2.31	**0.0288***
B族維生素*葉酸	-0.022614	0.010243	-2.21	**0.0356***

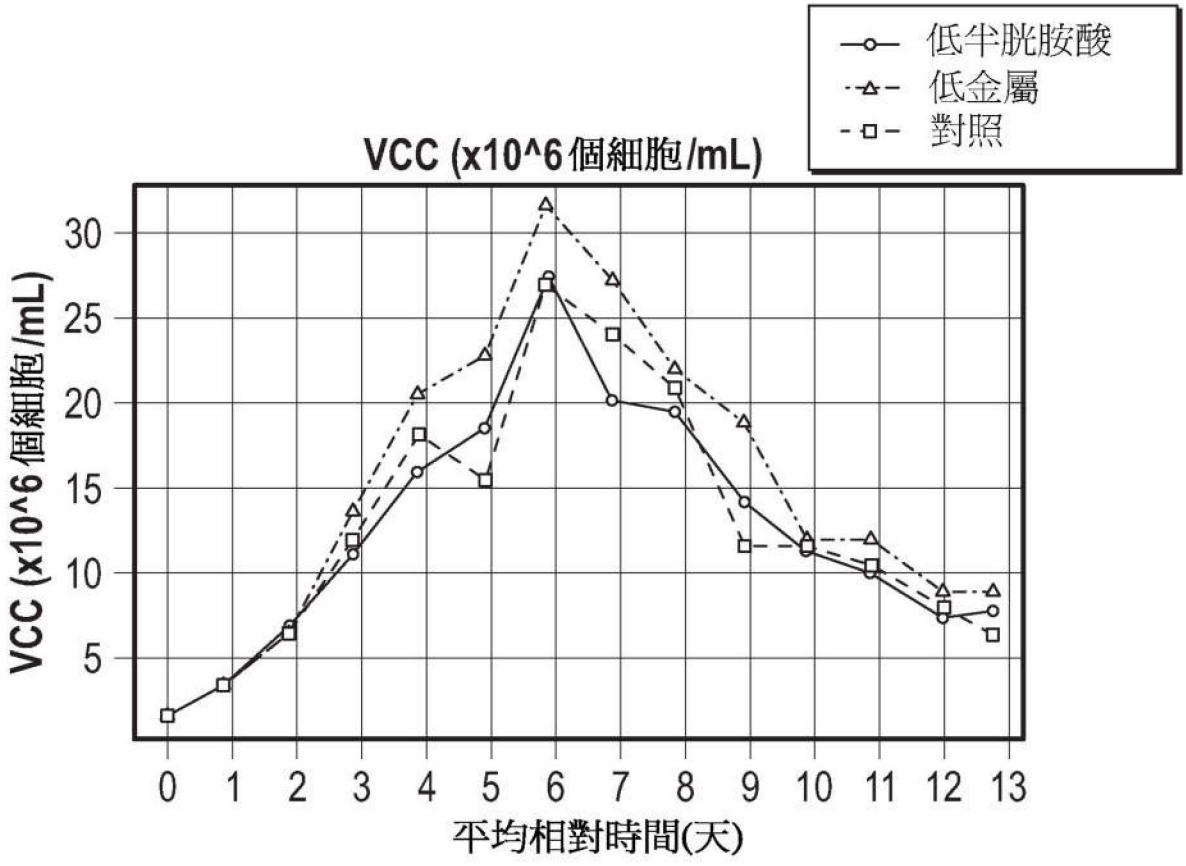
【圖 25A】



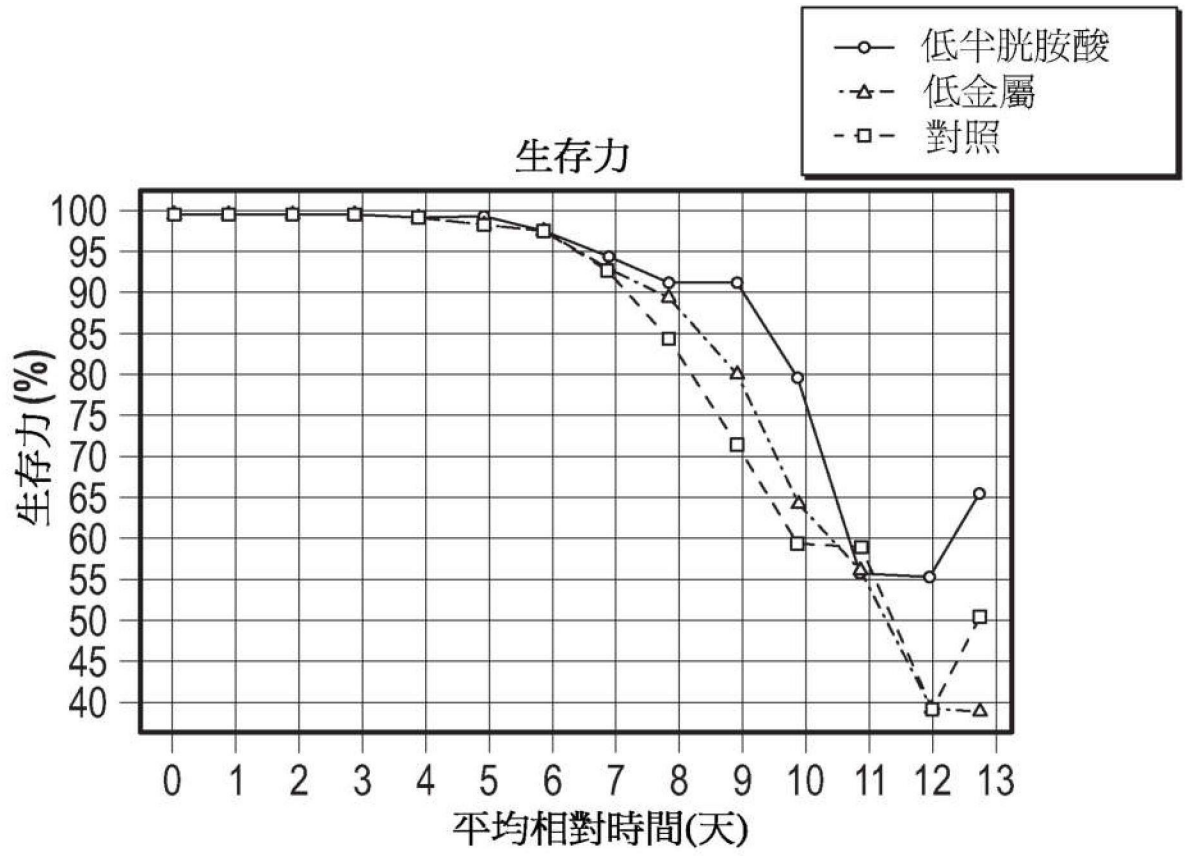
【圖 25B】


低牛胱胺酸
低金屬
對照
力價 (g/L)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
平均相對時間(天)

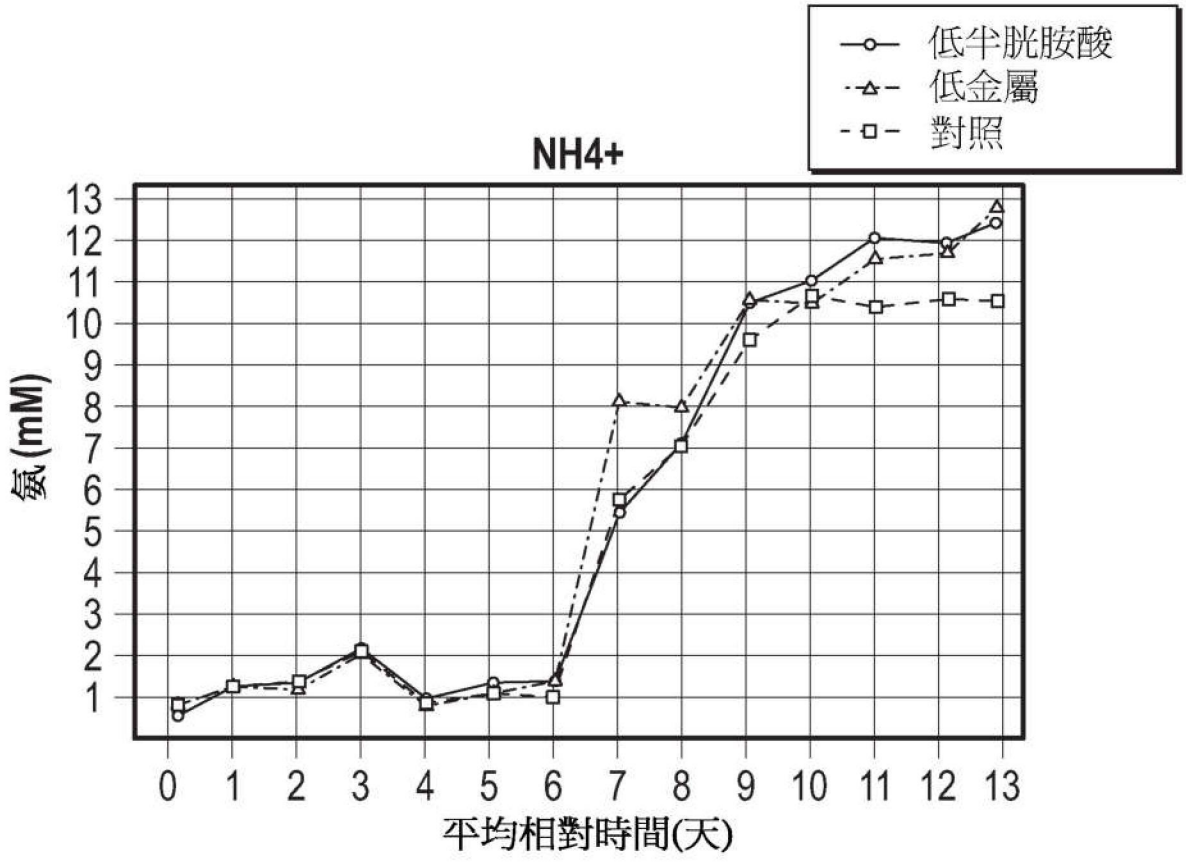
【圖 26A】


低牛胱胺酸
低金屬
對照
VCC (x10^6 個細胞/mL)
VCC (x10^6 個細胞/mL)
30
25
20
15
10
5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
平均相對時間(天)

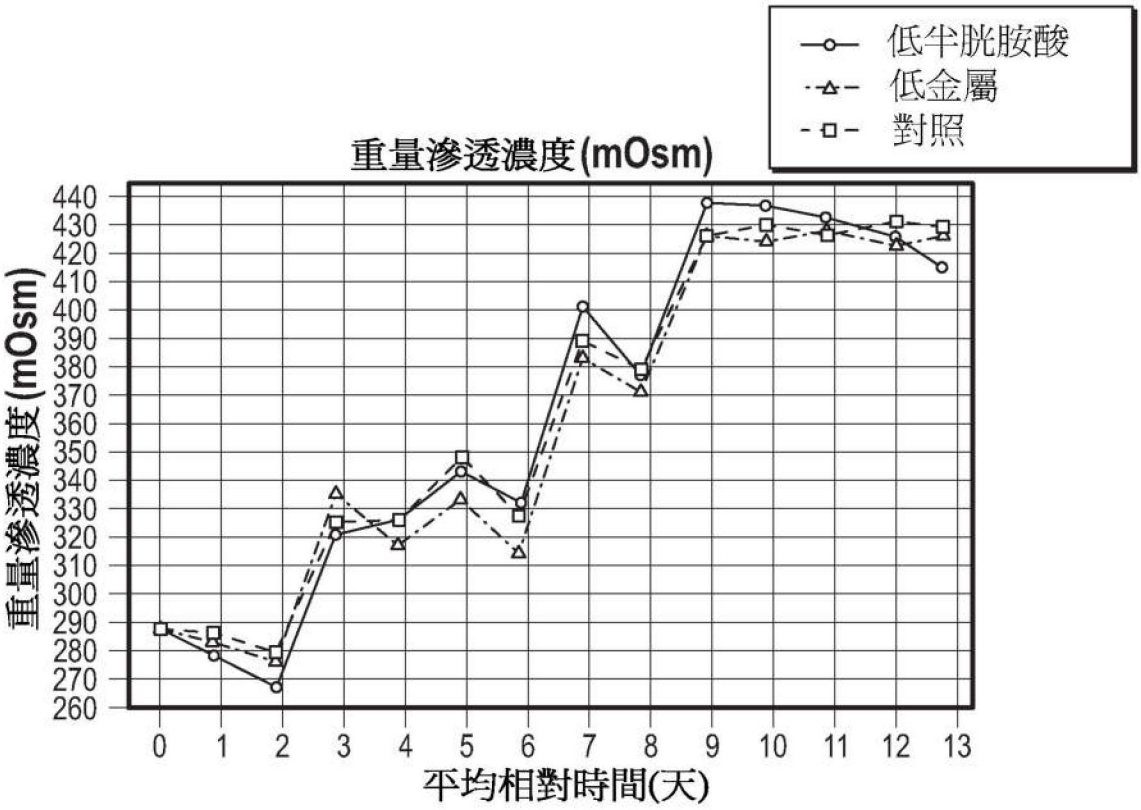
【圖 26B】


低半胱胺酸
低金屬
對照
生存力
生存力(%)
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
平均相對時間(天)

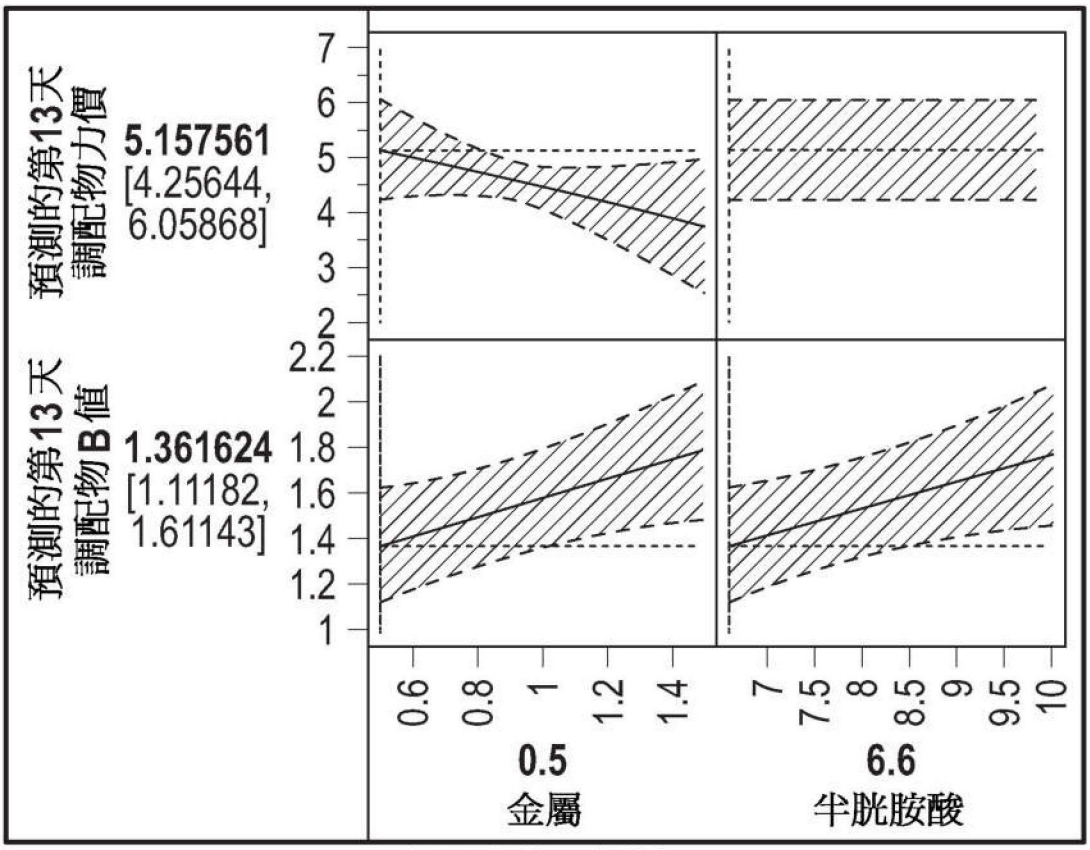
【圖 26C】


低半胱胺酸
低金屬
對照
NH4+
氨(mM)
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
平均相對時間(天)

【圖 26D】

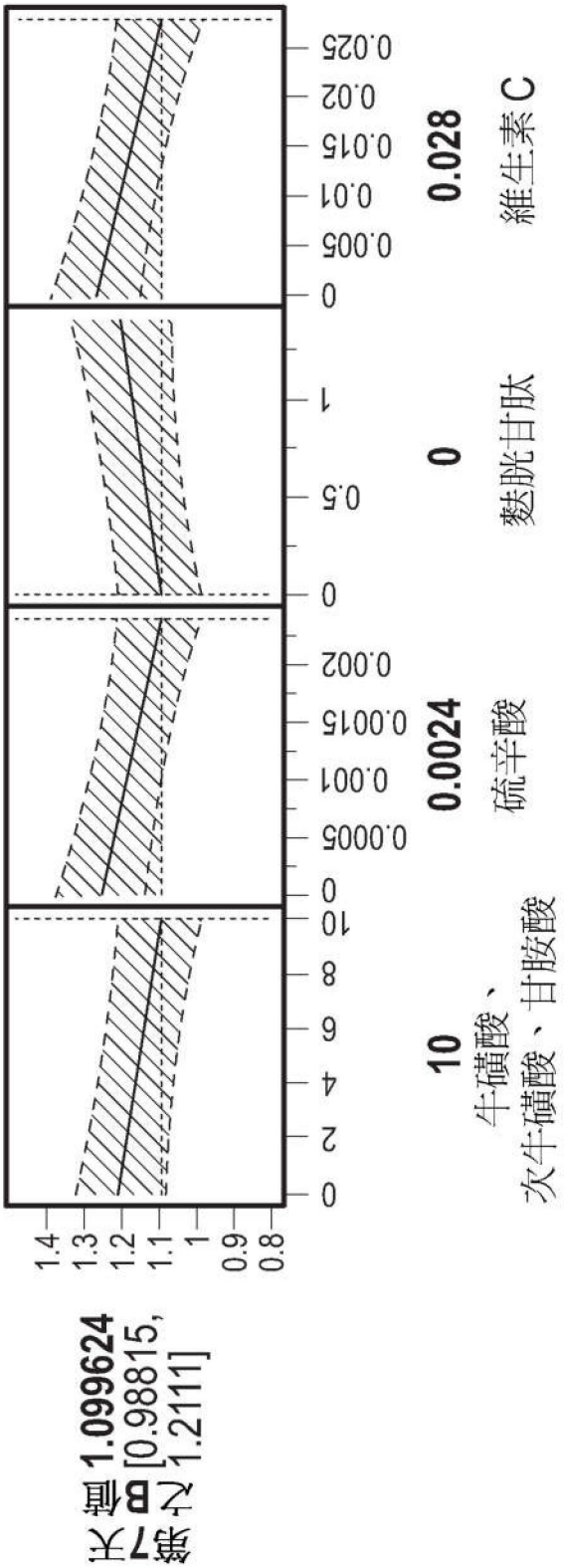


【圖 26E】

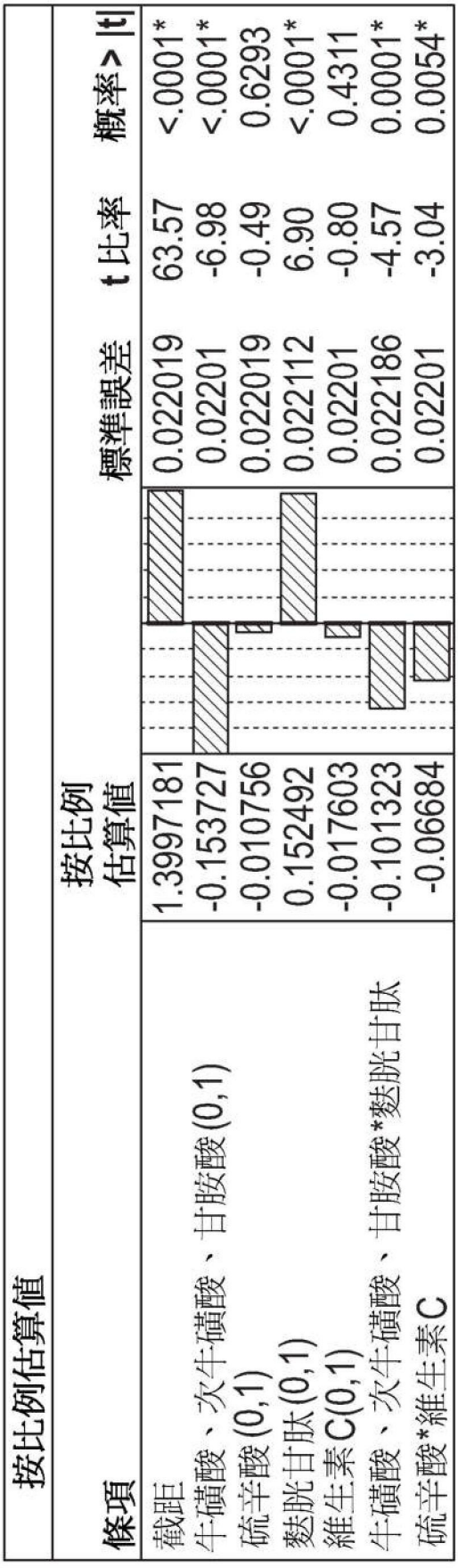


對照b值 = 1.67

【圖 27】

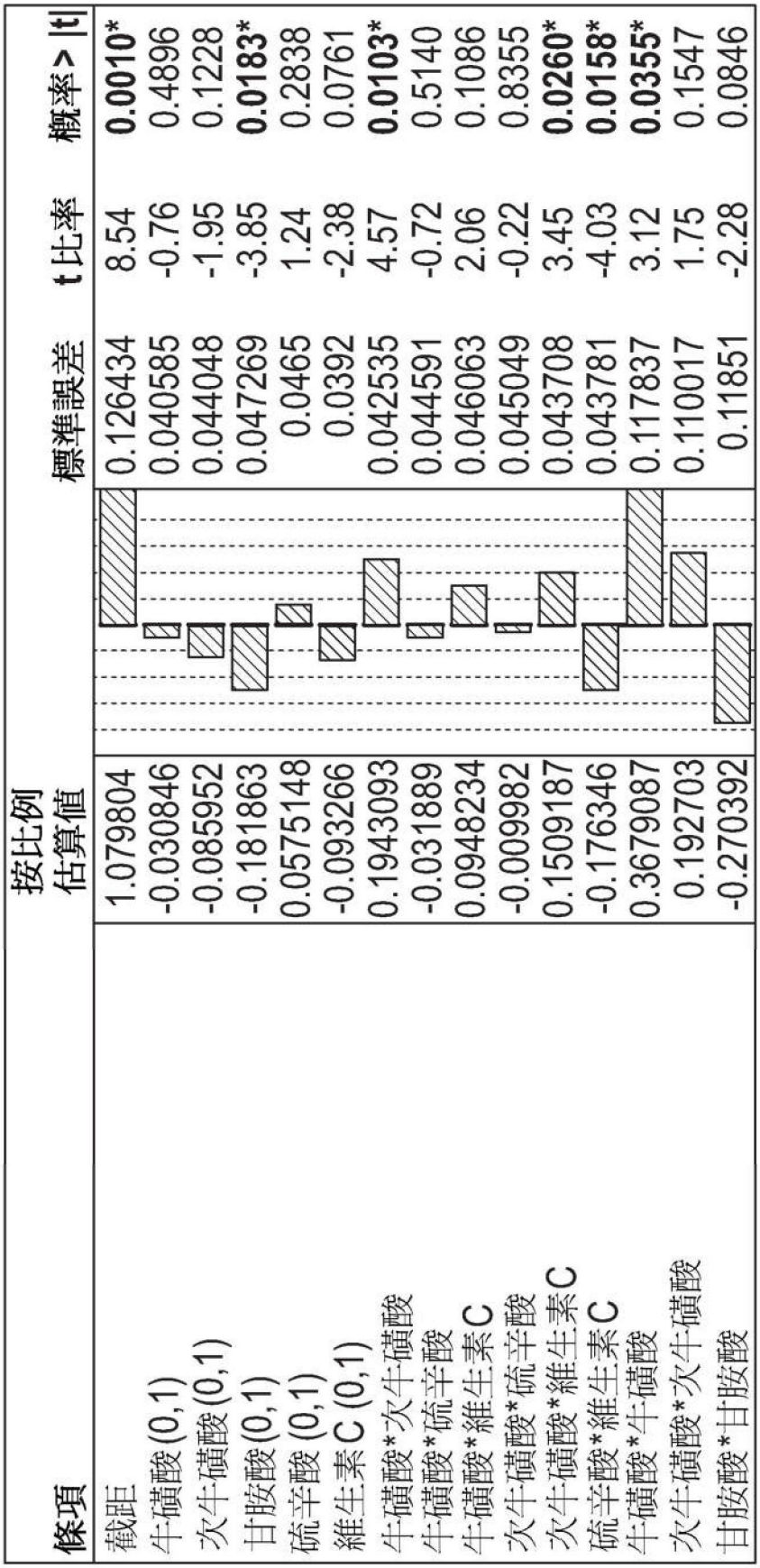

第7天
B值
1.099624
[0.98815,
1.2111]
1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
0
2
4
6
8
10
牛磺酸、
次牛磺酸、甘胺酸
10
0
0.0005
0.001
0.0015
0.002
硫辛酸
0.0024
0
0.5
1
麩胱甘肽
0
0
0.005
0.01
0.015
0.02
0.025
維生素C
0.028

【圖 28A】



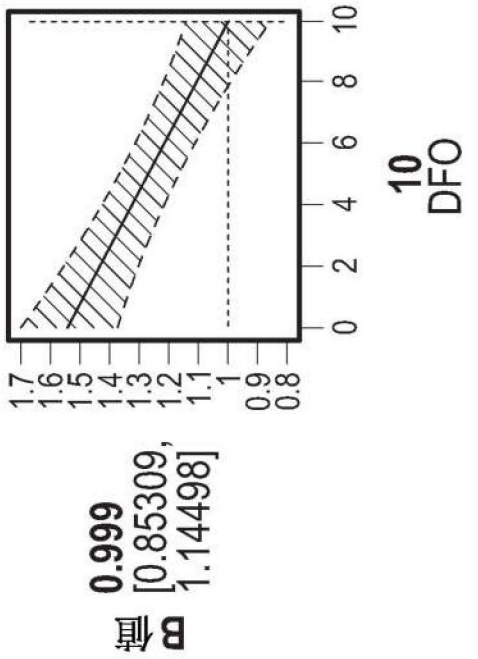
按比例估算值					
條項	按比例估算值	標準誤差	t 比率	概率 > |t|
截距	1.3997181	0.022019	63.57	<.0001*
牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸(0,1)	-0.153727	0.02201	-6.98	<.0001*
硫辛酸(0,1)	-0.010756	0.022019	-0.49	0.6293
麩胱甘肽(0,1)	0.152492	0.022112	6.90	<.0001*
維生素C(0,1)	-0.017603	0.02201	-0.80	0.4311
牛磺酸、次牛磺酸、甘胺酸*麩胱甘肽	-0.101323	0.022186	-4.57	0.0001*
硫辛酸*維生素C	-0.06684	0.02201	-3.04	0.0054*

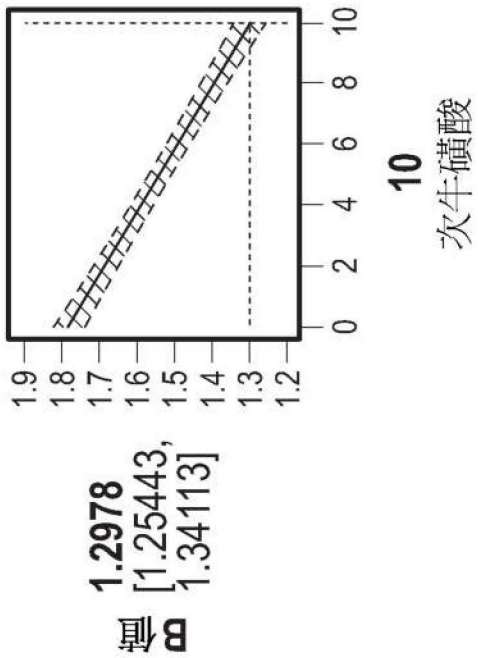
【圖 28B】



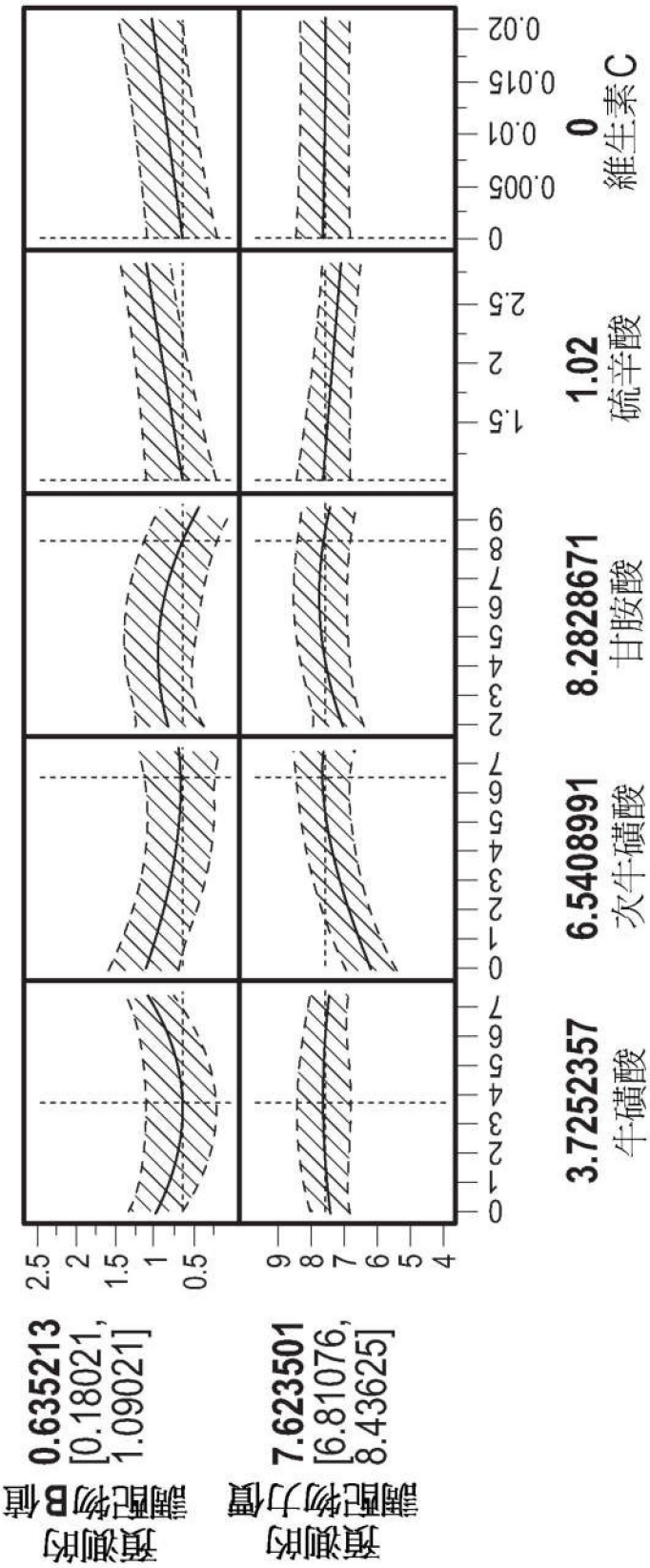
條項	按比例估算值	標準誤差	t 比率	概率 > |t|
截距	1.079804	0.126434	8.54	**0.0010***
牛磺酸 (0,1)	-0.030846	0.040585	-0.76	0.4896
次牛磺酸 (0,1)	-0.085952	0.044048	-1.95	0.1228
甘胺酸 (0,1)	-0.181863	0.047269	-3.85	**0.0183***
硫辛酸 (0,1)	0.0575148	0.0465	1.24	0.2838
維生素 C (0,1)	-0.093266	0.0392	-2.38	0.0761
牛磺酸*次牛磺酸	0.1943093	0.042535	4.57	**0.0103***
牛磺酸*硫辛酸	-0.031889	0.044591	-0.72	0.5140
牛磺酸*維生素 C	0.0948234	0.046063	2.06	0.1086
次牛磺酸*硫辛酸	-0.009982	0.045049	-0.22	0.8355
次牛磺酸*維生素 C	0.1509187	0.043708	3.45	**0.0260***
硫辛酸*維生素 C	-0.176346	0.043781	-4.03	**0.0158***
牛磺酸*牛磺酸	0.3679087	0.117837	3.12	**0.0355***
次牛磺酸*次牛磺酸	0.192703	0.110017	1.75	0.1547
甘胺酸*甘胺酸	-0.270392	0.11851	-2.28	0.0846

【圖 28C】

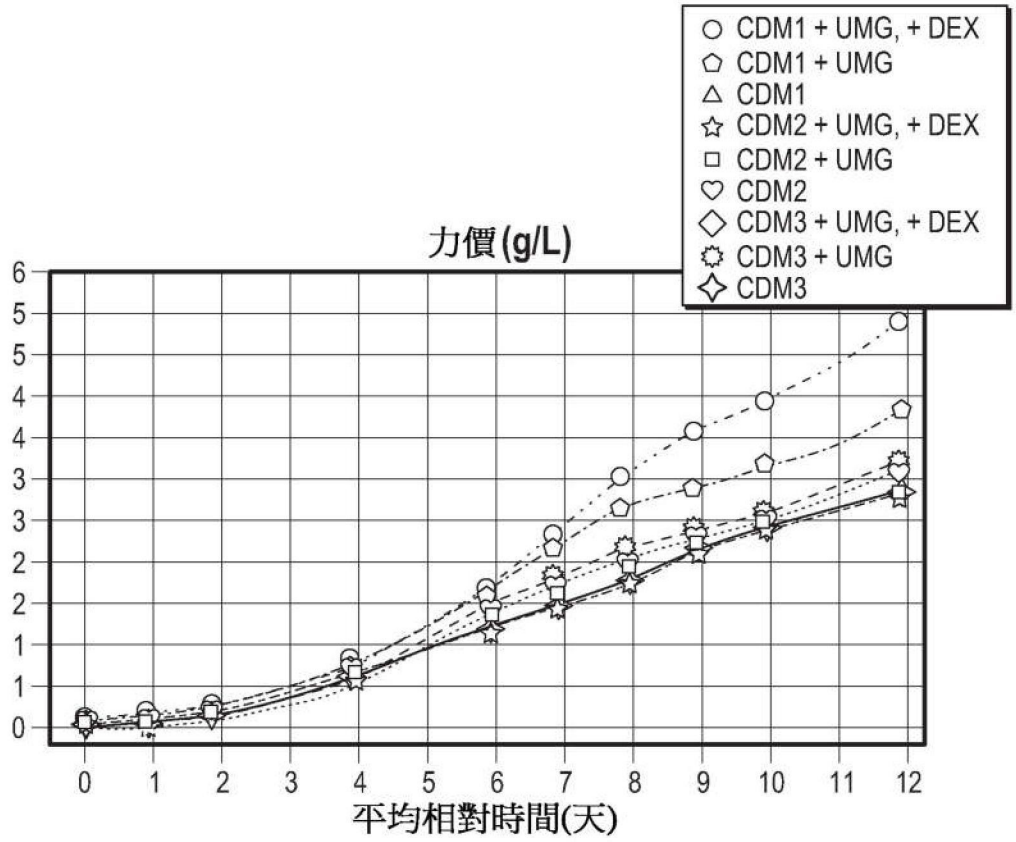

10
DFO
0 2 4 6 8 10
1.7 1.6 1.5 1.4 1.3 1.2 1.1 1 0.9 0.8
B值
0.999
[0.85309, 1.14498]


10
次牛磺酸
0 2 4 6 8 10
1.9 1.8 1.7 1.6 1.5 1.4 1.3 1.2
B值
1.2978
[1.25443, 1.34113]

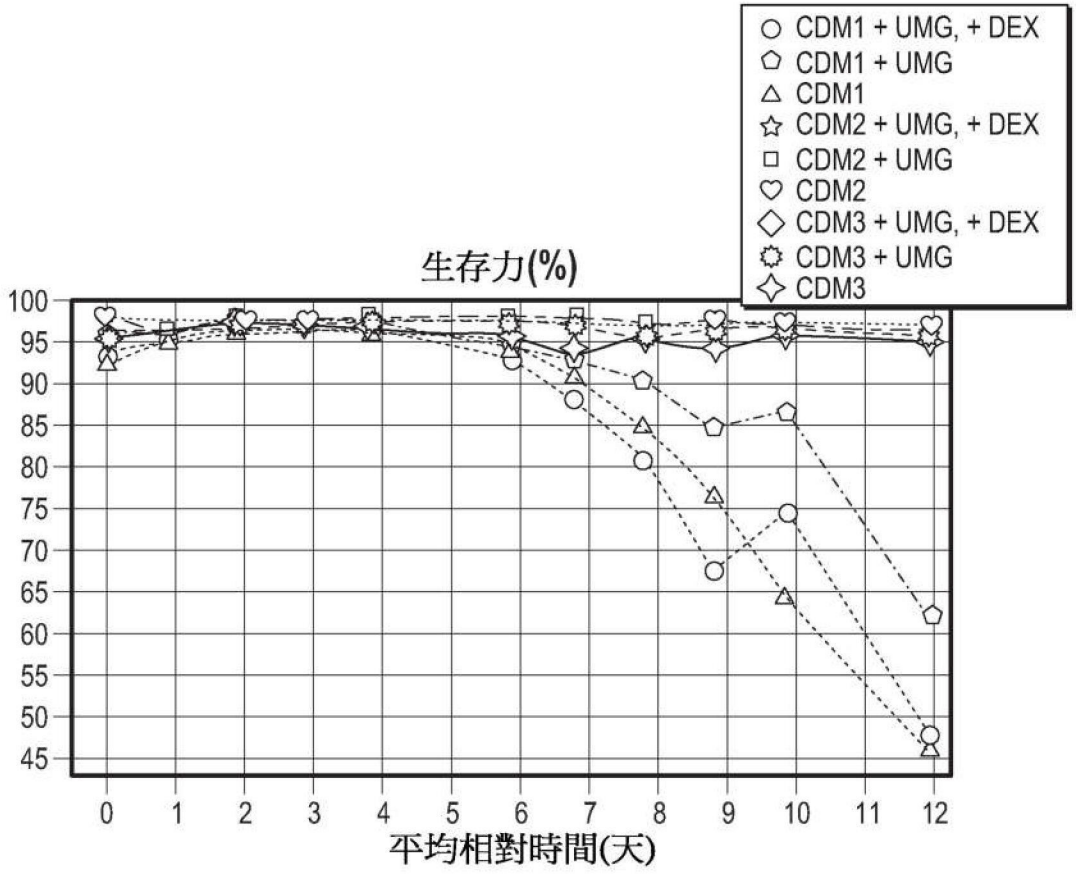
【圖 28D】


預測的
調配物力價
7.623501
[6.81076,
8.43625]
預測的
調配物B值
0.635213
[0.18021,
1.09021]
3.7252357
牛磺酸
6.5408991
次牛磺酸
8.2828671
甘胺酸
1.02
硫辛酸
0
維生素C

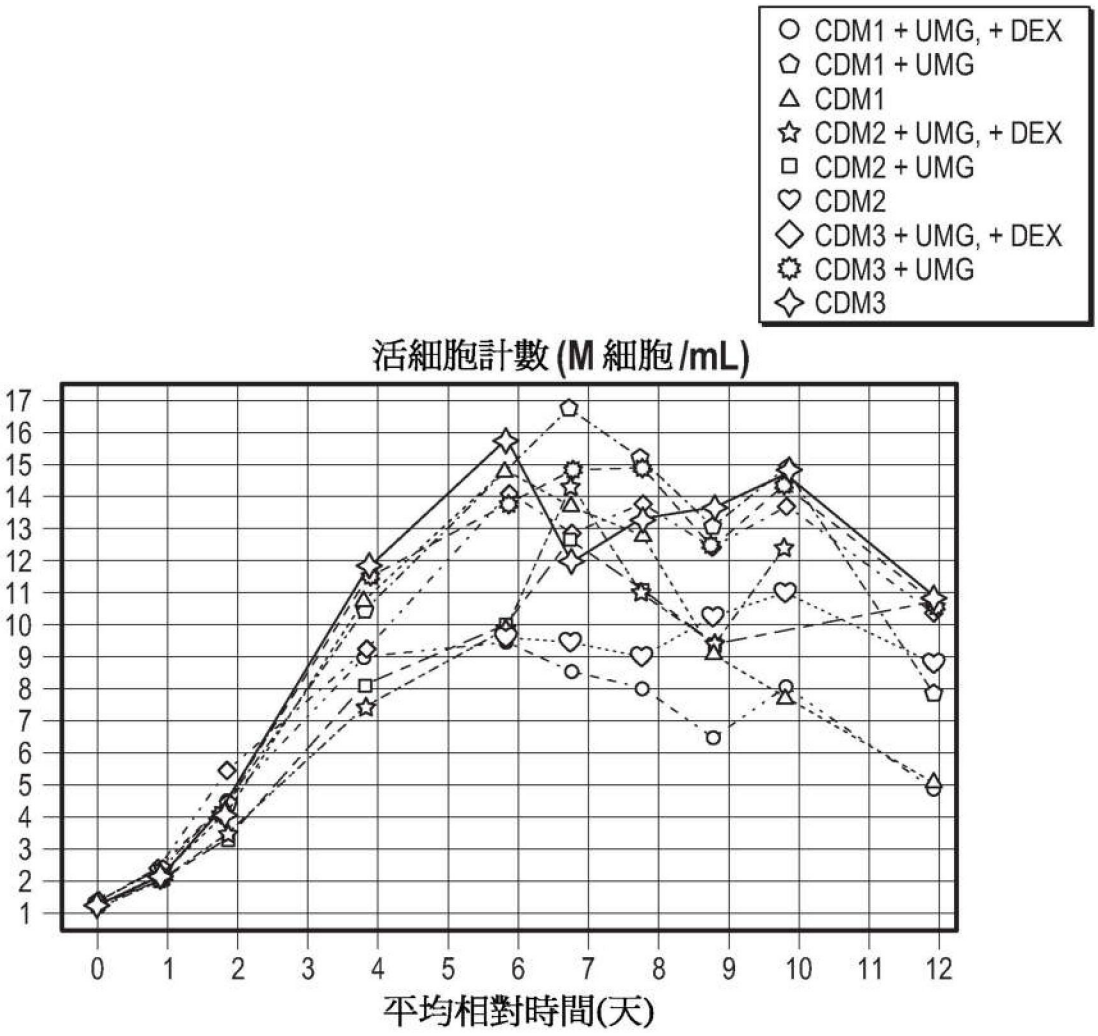
【圖 28E】


CDM1 + UMG, + DEX
CDM1 + UMG
CDM1
CDM2 + UMG, + DEX
CDM2 + UMG
CDM2
CDM3 + UMG, + DEX
CDM3 + UMG
CDM3
力價(g/L)
平均相對時間(天)

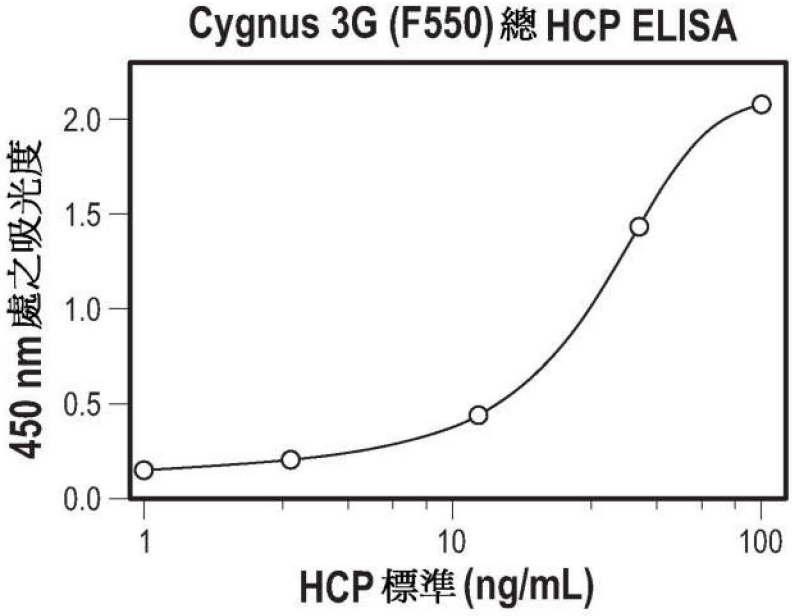
【圖 29】


CDM1 + UMG, + DEX
CDM1 + UMG
CDM1
CDM2 + UMG, + DEX
CDM2 + UMG
CDM2
CDM3 + UMG, + DEX
CDM3 + UMG
CDM3
生存力(%)
平均相對時間(天)

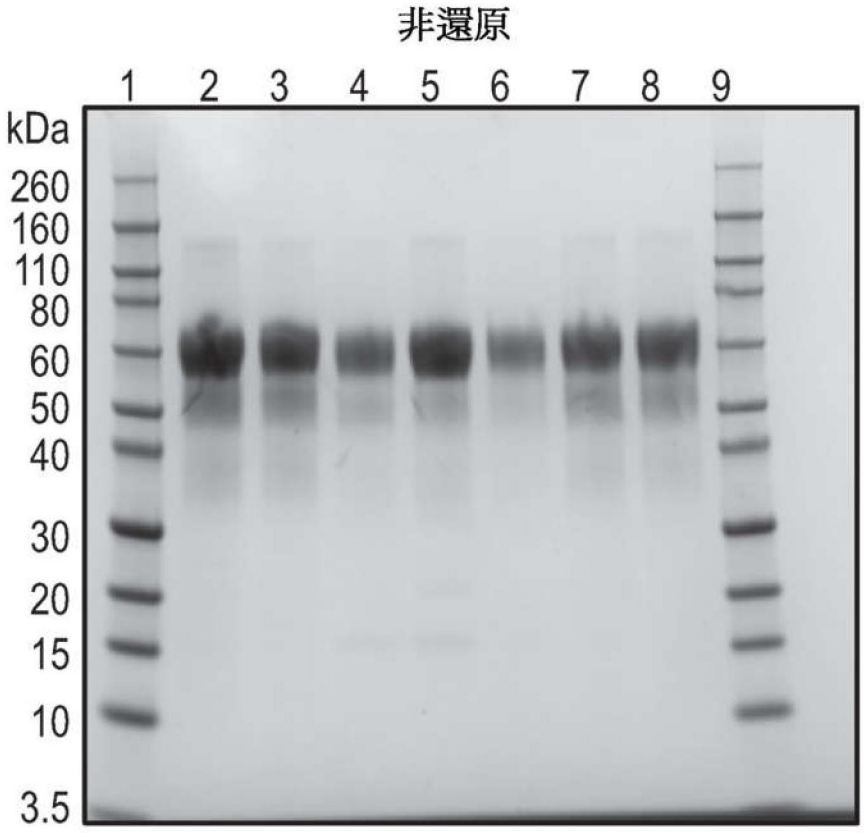
【圖 30】


CDM1 + UMG, + DEX
CDM1 + UMG
CDM1
CDM2 + UMG, + DEX
CDM2 + UMG
CDM2
CDM3 + UMG, + DEX
CDM3 + UMG
CDM3
活細胞計數 (M 細胞 /mL)
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
平均相對時間(天)

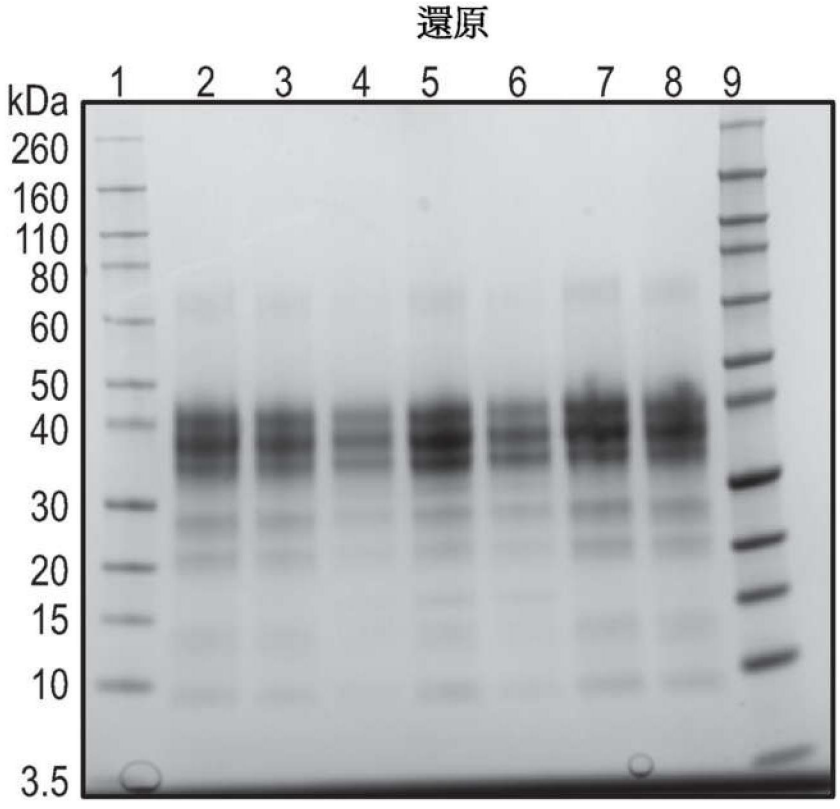
【圖 31】


Cygnus 3G (F550) 總 HCP ELISA
450 nm 處之吸光度
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
HCP 標準 (ng/mL)

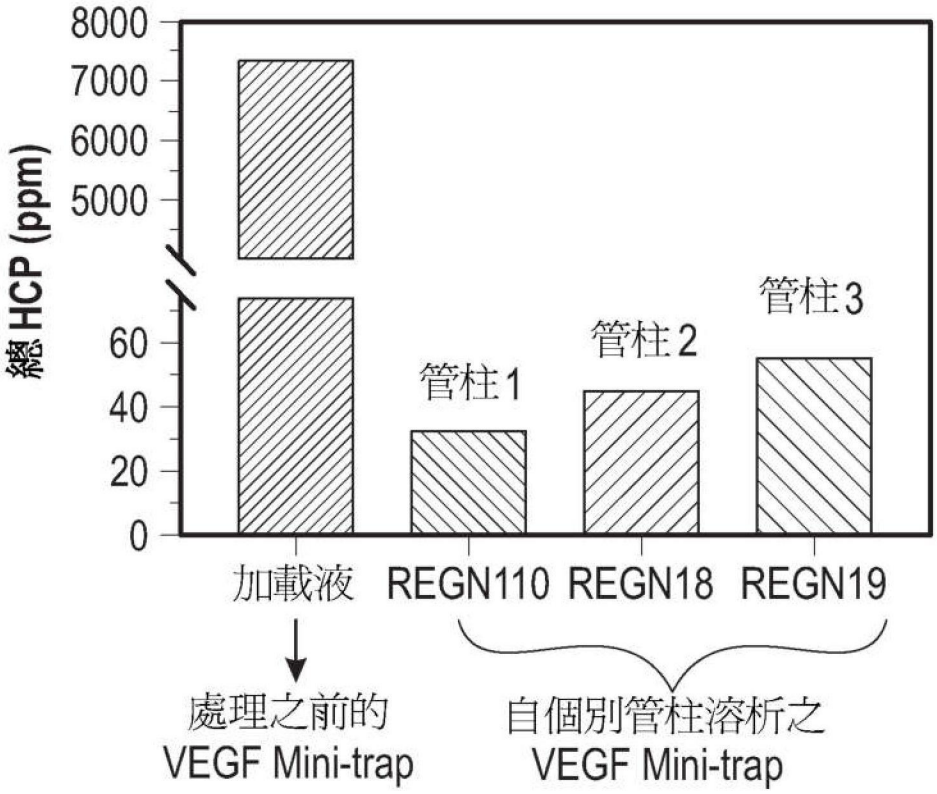
【圖 32】


非還原
1 2 3 4 5 6 7 8 9
kDa
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
3.5

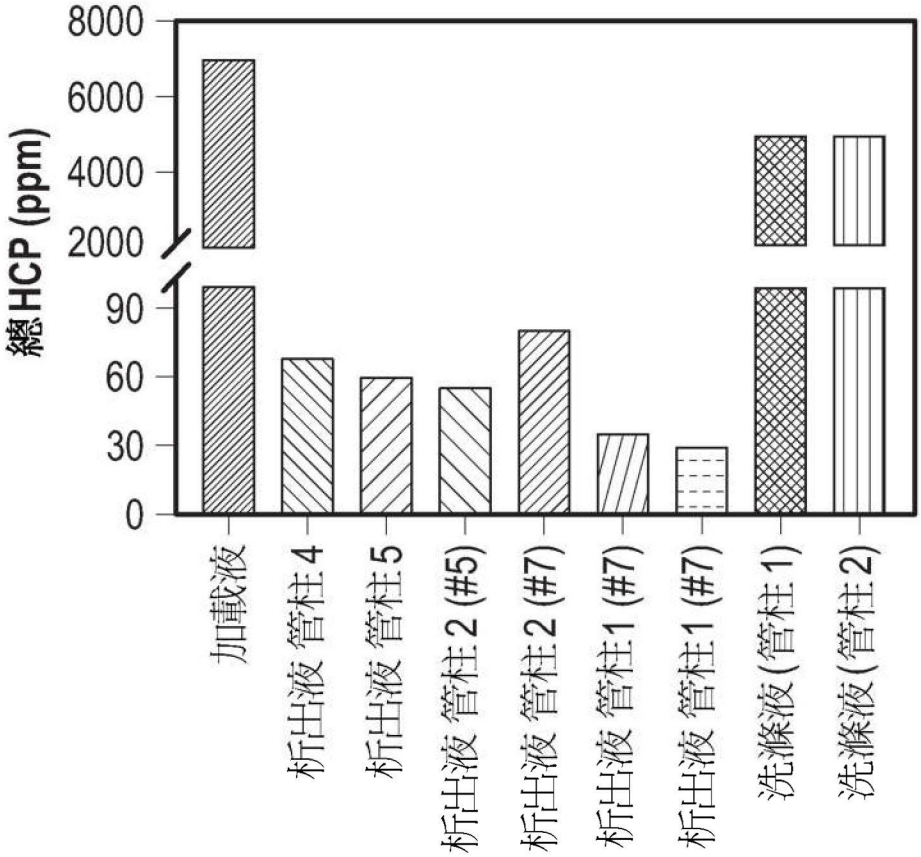
【圖 33】


還原
1 2 3 4 5 6 7 8 9
kDa
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
3.5

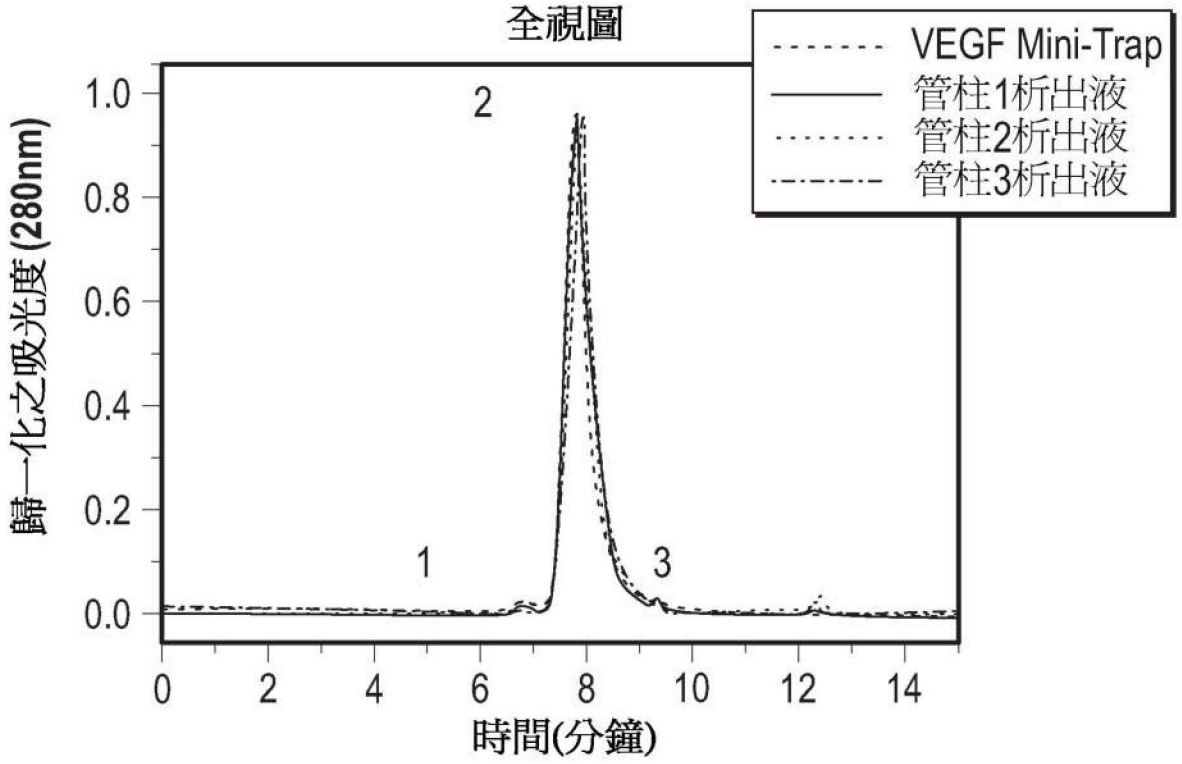
【圖 34】


總 HCP (ppm)
8000
7000
6000
5000
60
40
20
0
管柱 1
管柱 2
管柱 3
加載液
REGN110
REGN18
REGN19
處理之前的
VEGF Mini-trap
自個別管柱溶析之
VEGF Mini-trap

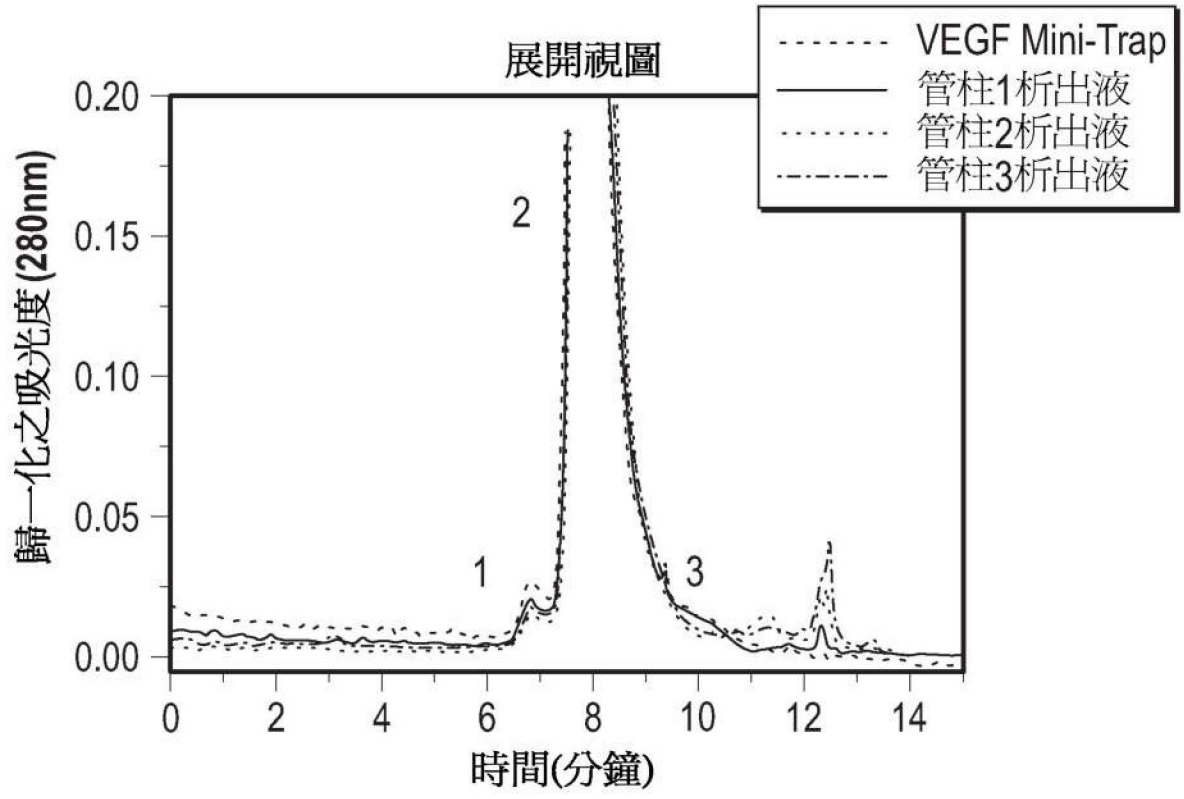
【圖 35A】


總 HCP (ppm)
8000
6000
4000
2000
90
60
30
0
加載液
析出液 管柱 4
析出液 管柱 5
析出液 管柱 2 (#5)
析出液 管柱 2 (#7)
析出液 管柱 1 (#7)
析出液 管柱 1 (#7)
洗滌液 (管柱 1)
洗滌液 (管柱 2)

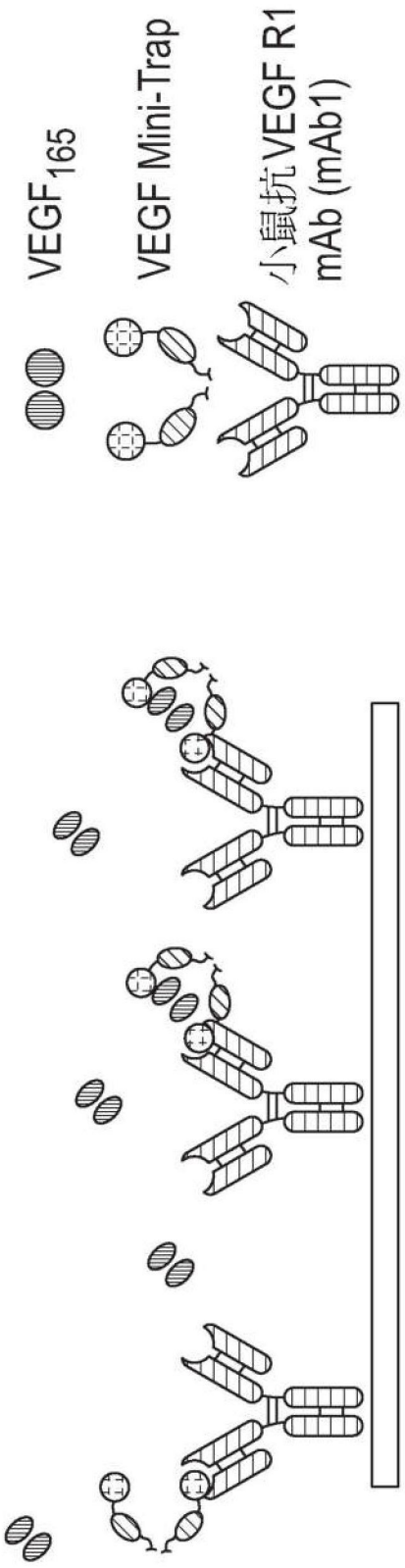
【圖 35B】


全視圖
VEGF Mini-Trap
管柱1析出液
管柱2析出液
管柱3析出液
歸一化之吸光度(280nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
時間(分鐘)
1
2
3

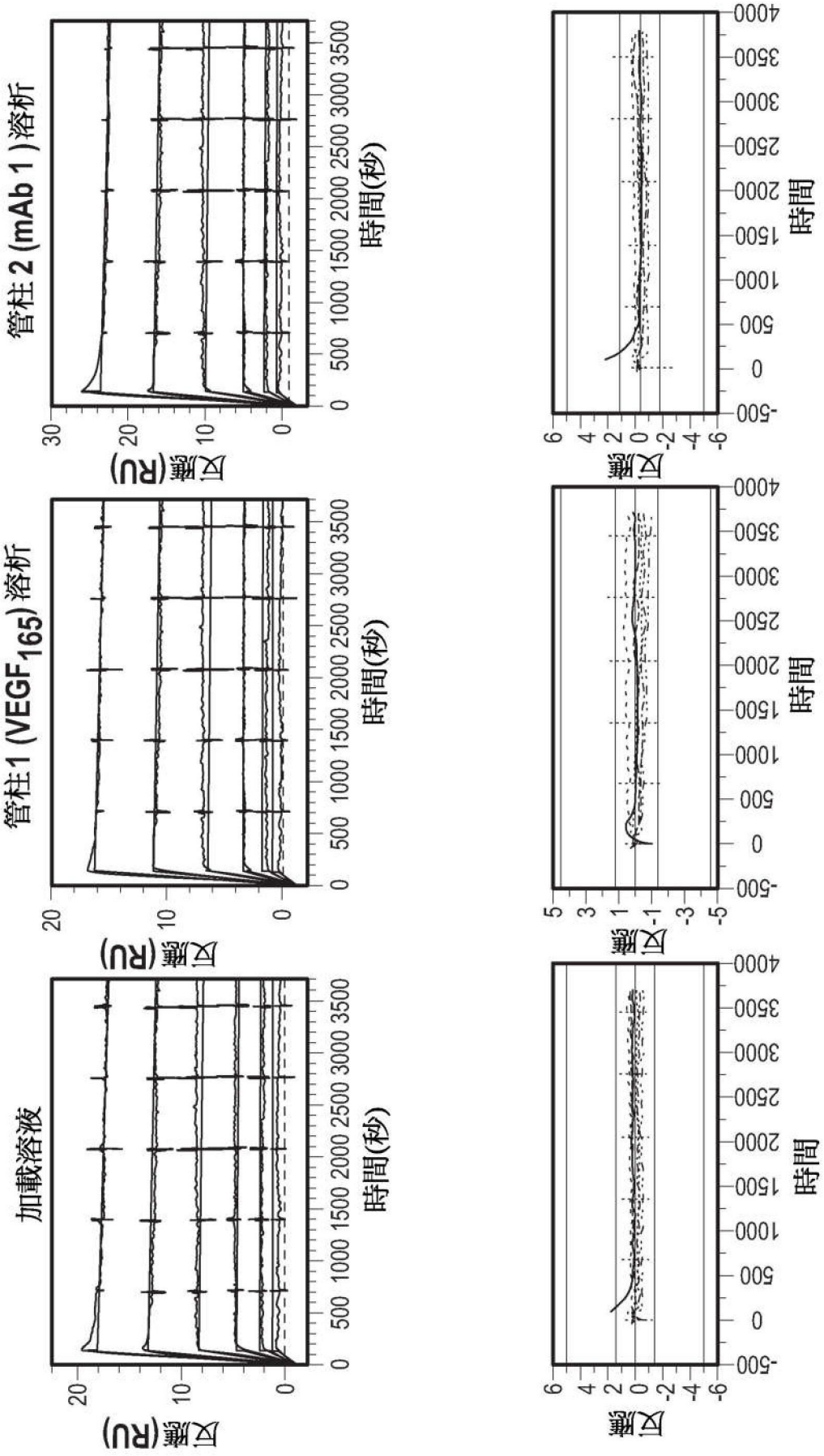
【圖 36A】


展開視圖
VEGF Mini-Trap
管柱1析出液
管柱2析出液
管柱3析出液
歸一化之吸光度(280nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
2
4
6
8
10
12
14
時間(分鐘)
1
2
3

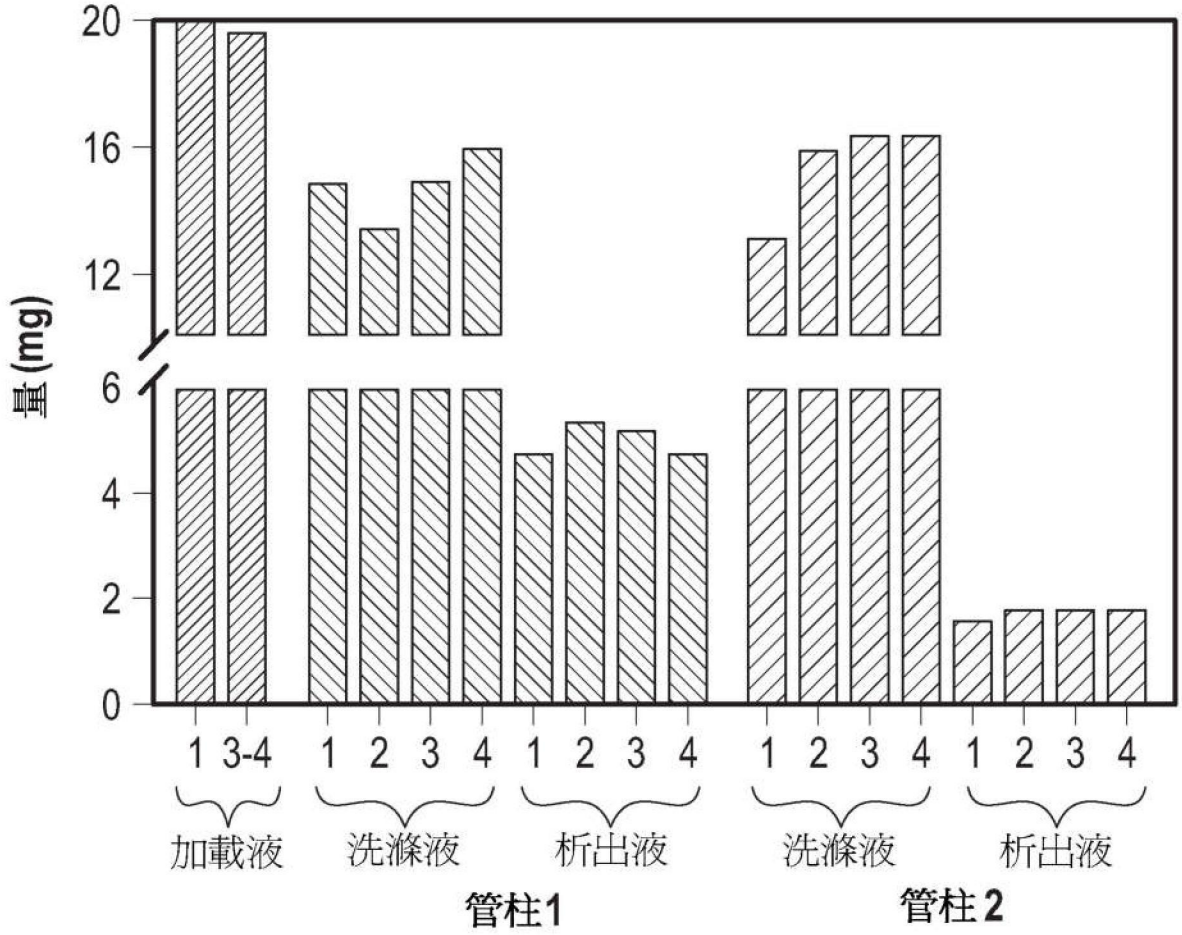
【圖 36B】



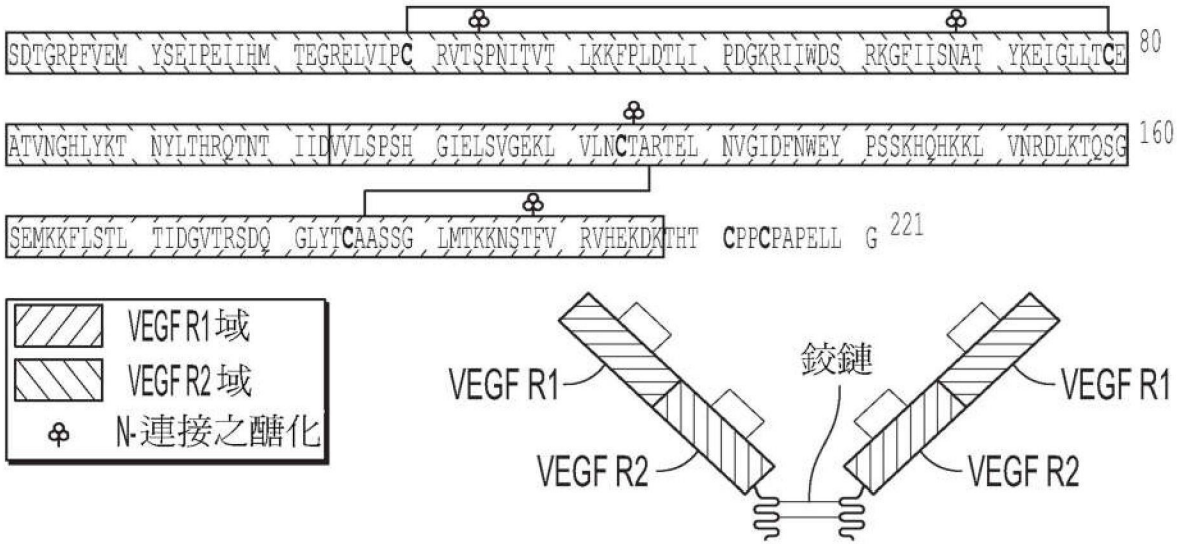
【圖 37】



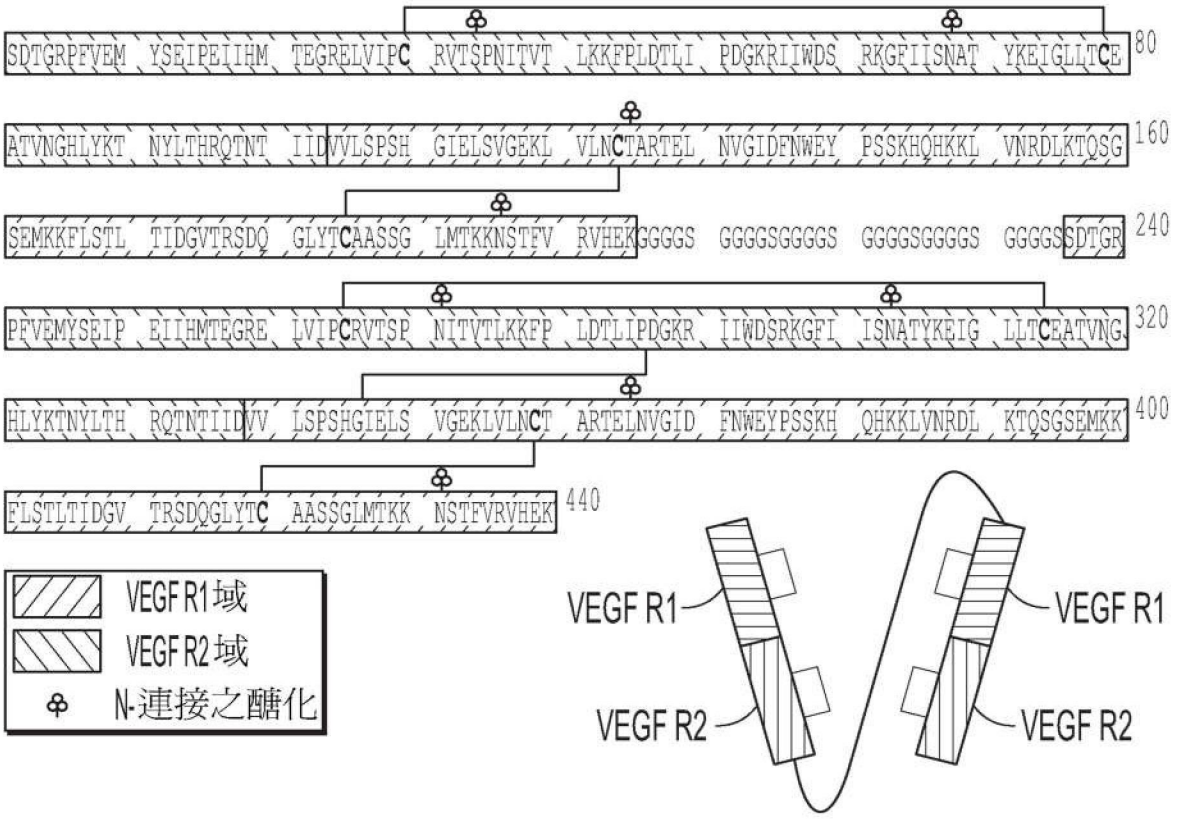
【圖 38】


20
16
12
6
4
2
0
量(mg)
1 3-4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
加載液
洗滌液
析出液
洗滌液
析出液
管柱1
管柱2

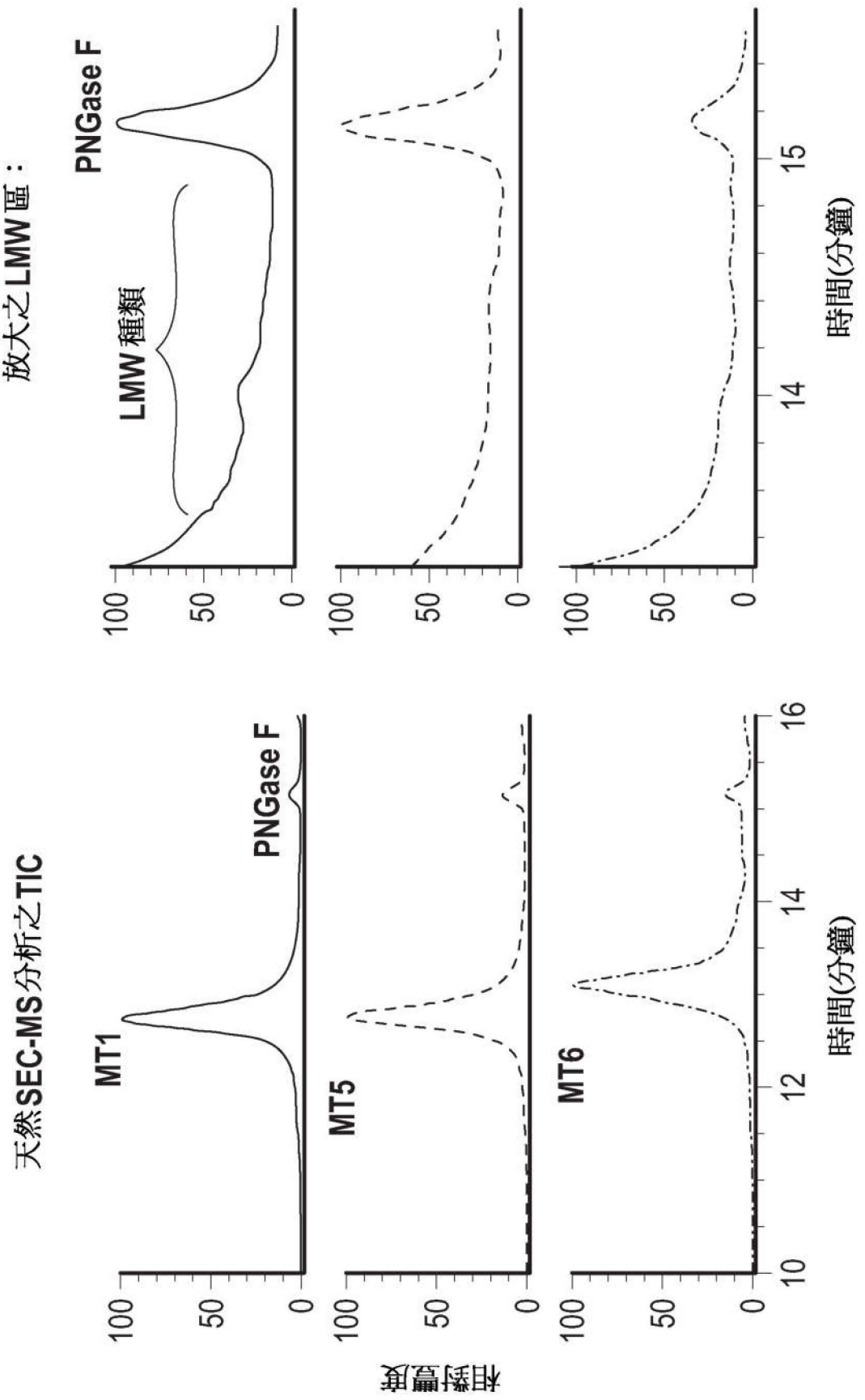
【圖 39】


SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE 80
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG 160
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPELL G 221
VEGF R1域
VEGF R2域
N-連接之醣化
VEGF R1
VEGF R2
鉸鏈
VEGF R1
VEGF R2

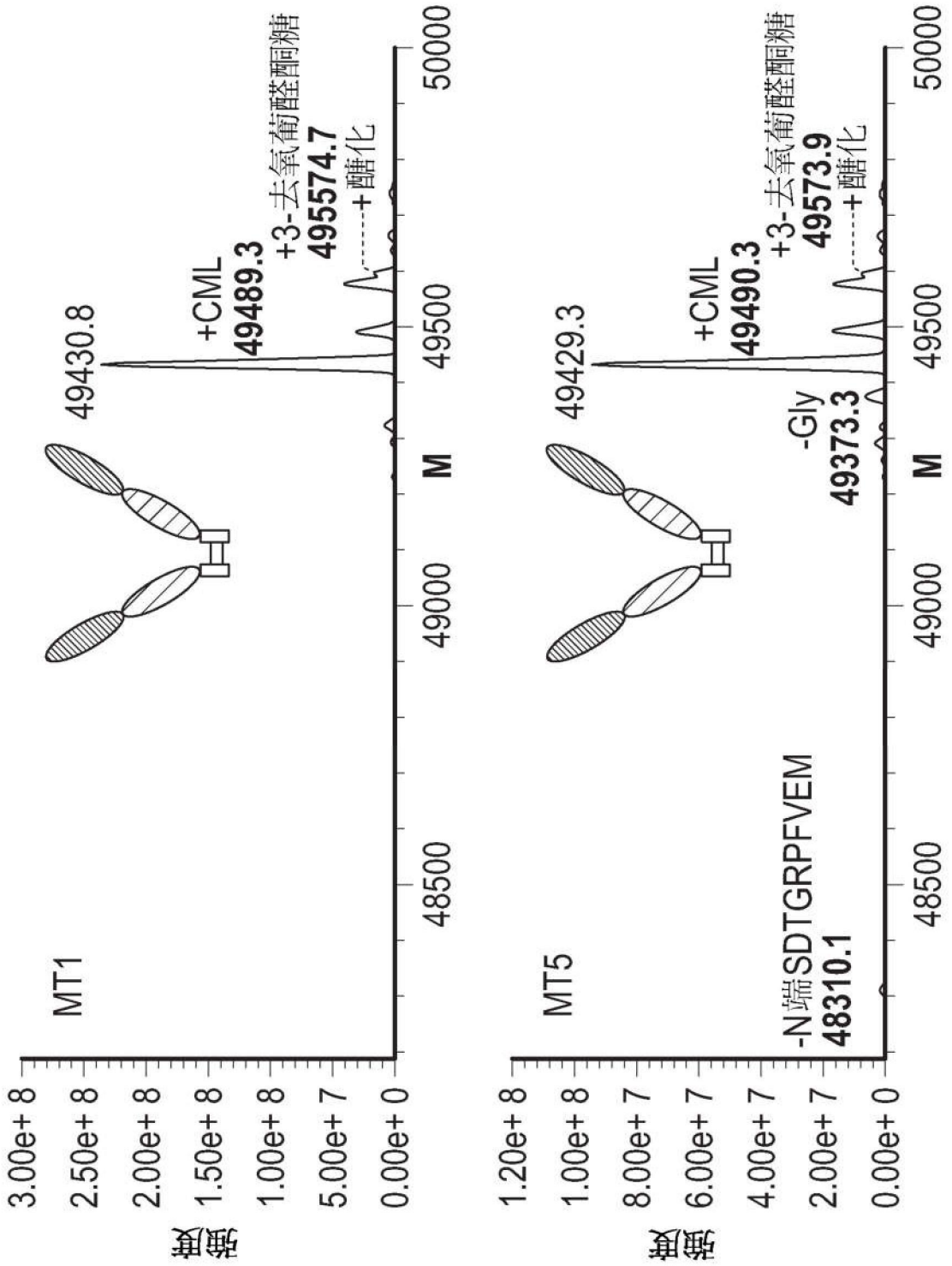
【圖 40】


SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE 80
ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG 160
SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSSDTGR 240
PFVEMYSEIP EIIHMTEGRE LVIPCRVTSP NITVTLKKFP LDTLIPDGKR IIWDSRKGFI ISNATYKEIG LLTCEATVNG 320
HLYKTNYLTH RQTNTIIDVV LSPSHGIELS VGEKLVLNCT ARTELNVGID FNWEYPSSKH QHKKLVNRDL KTQSGSEMKK 400
FLSTLTIDGV TRSDQGLYTC AASSGLMTKK NSTFVRVHEK 440
VEGF R1域
VEGF R2域
N-連接之醣化
VEGF R1
VEGF R2
VEGF R1
VEGF R2

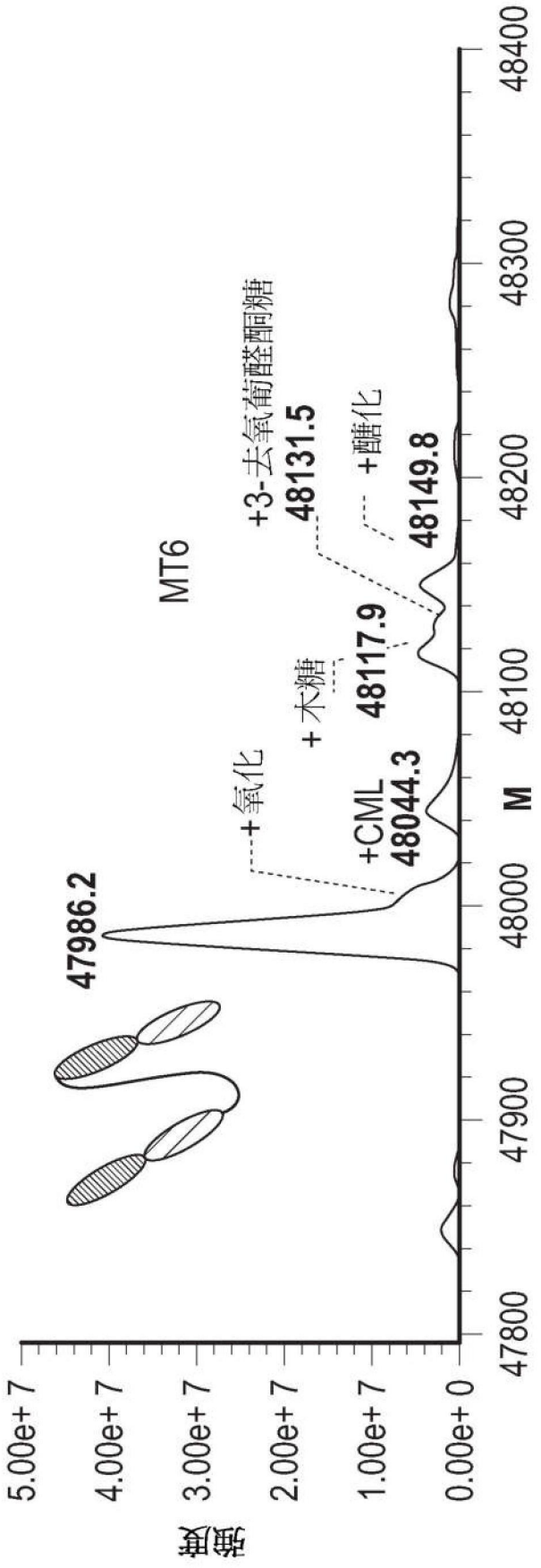
【圖 41】


天然SEC-MS分析之TIC
MT1
PNGase F
MT5
MT6
相對豐度
時間(分鐘)
放大之LMW區：
PNGase F
LMW種類
時間(分鐘)

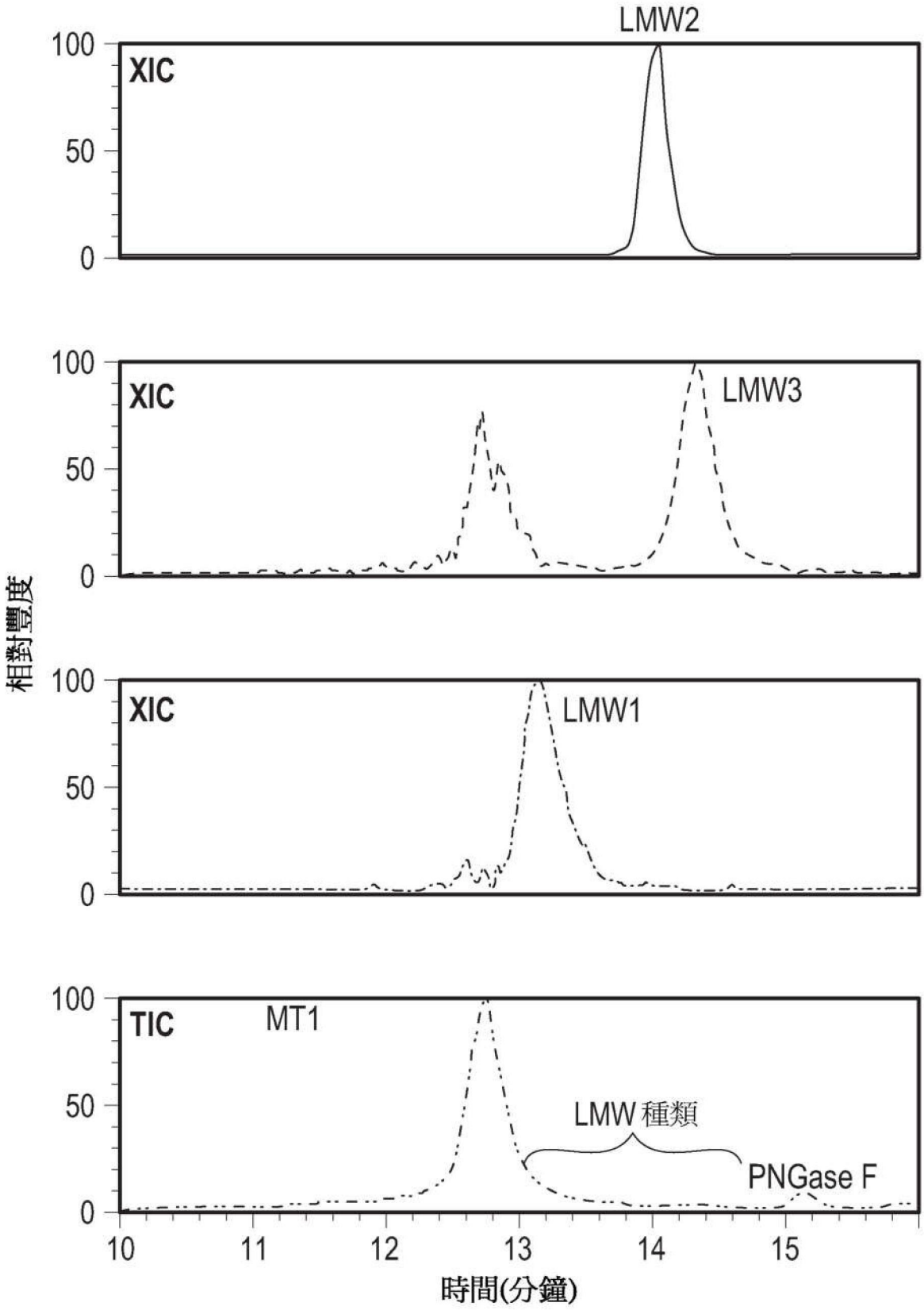
【圖 42】


MT1
49430.8
+CML
49489.3
+3-去氧葡醛酮糖
49574.7
+醣化
M
強度
3.00e+8
2.50e+8
2.00e+8
1.50e+8
1.00e+8
5.00e+7
0.00e+0
48500
49000
49500
50000
MT5
49429.3
+CML
49490.3
+3-去氧葡醛酮糖
49573.9
+醣化
-Gly
49373.3
-N端SDTGRPFVEM
48310.1
1.20e+8
1.00e+8
8.00e+7
6.00e+7
4.00e+7
2.00e+7
0.00e+0

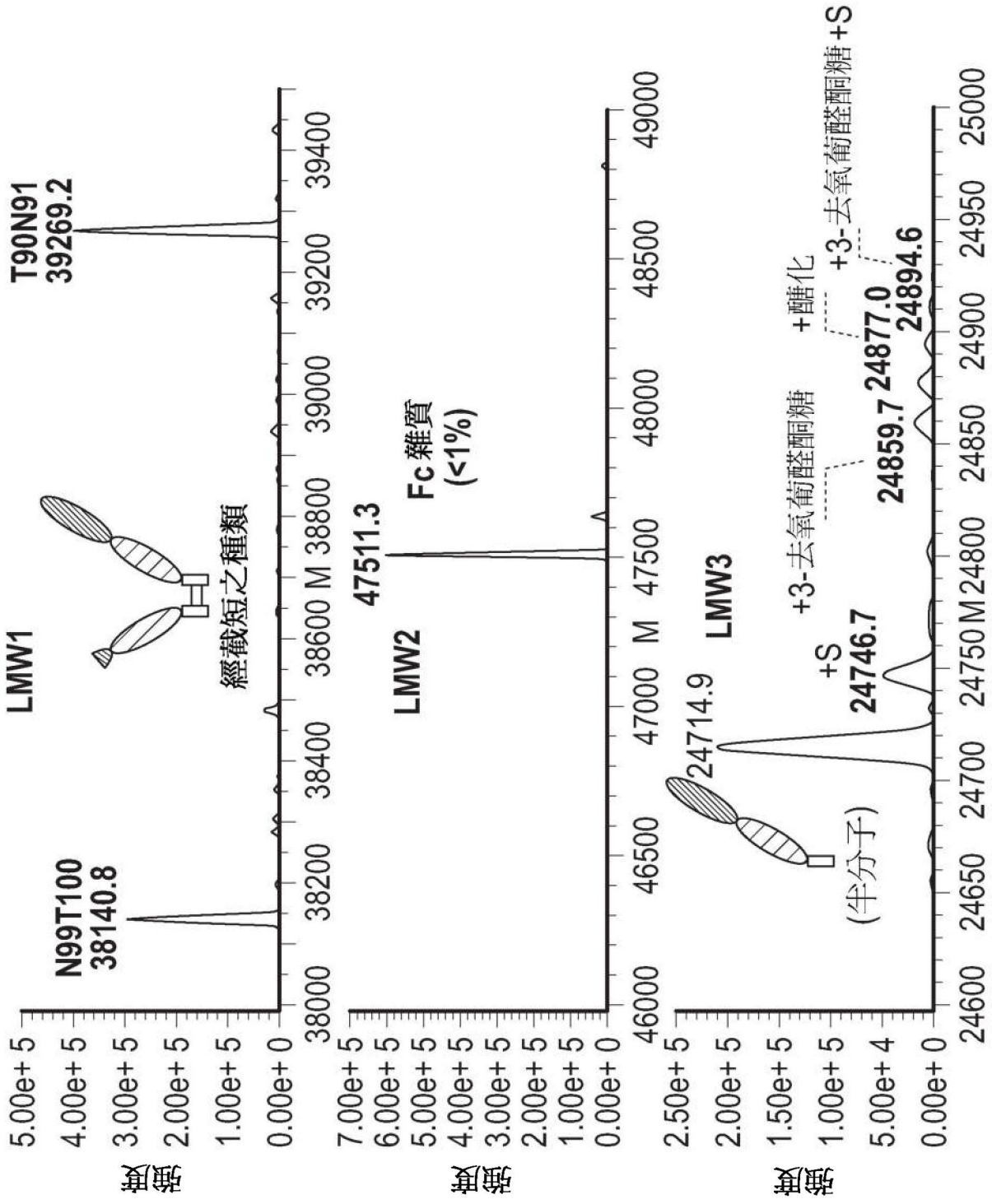
【圖 43】


MT6
47986.2
+氧化
+CML
48044.3
+木糖
48117.9
+3-去氧葡醛酮糖
48131.5
+醣化
48149.8
M
強度
5.00e+7
4.00e+7
3.00e+7
2.00e+7
1.00e+7
0.00e+0
47800
47900
48000
48100
48200
48300
48400

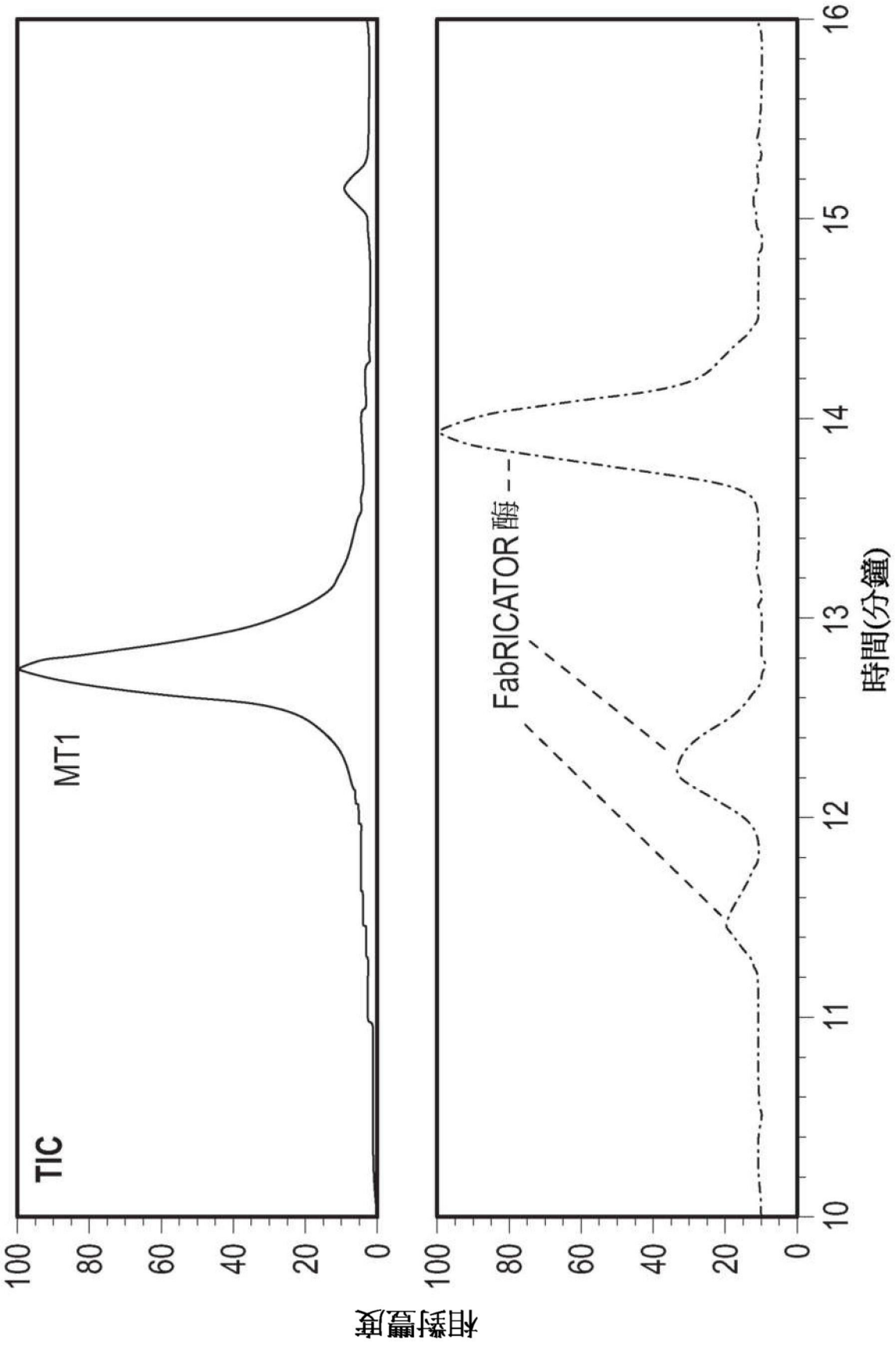
【圖 44】


LMW2
100
XIC
50
0
100
XIC
LMW3
50
0
相對豐度
100
XIC
LMW1
50
0
100
TIC
MT1
LMW 種類
50
PNGase F
0
10
11
12
13
14
15
時間(分鐘)

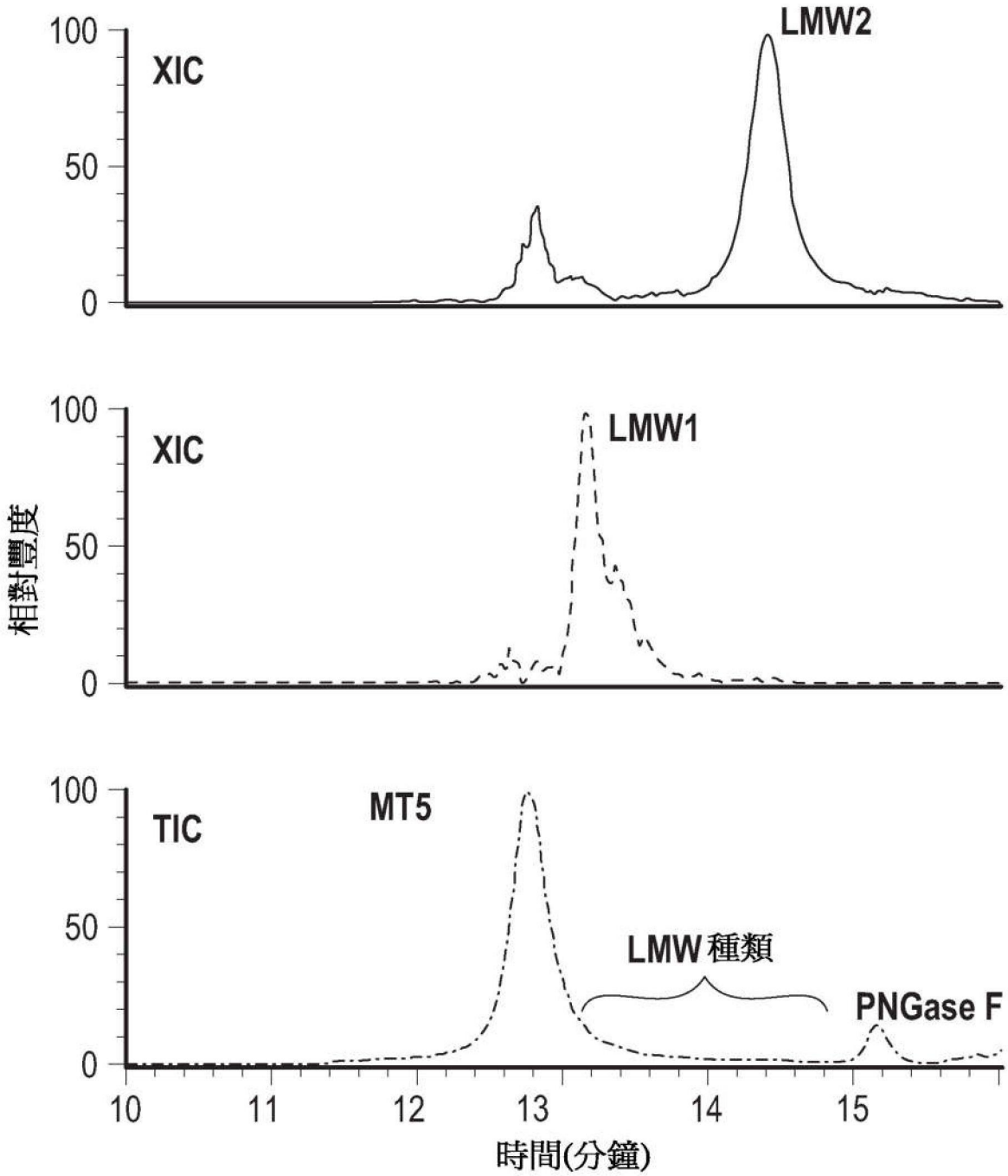
【圖 45A】


強度
LMW1
N99T100
38140.8
經截短之種類
T90N91
39269.2
LMW2
47511.3
Fc雜質
(<1%)
LMW3
24714.9
(半分子)
+S
24746.7
+3-去氧葡醛酮糖
24859.7
+醣化
24877.0
+3-去氧葡醛酮糖+S
24894.6

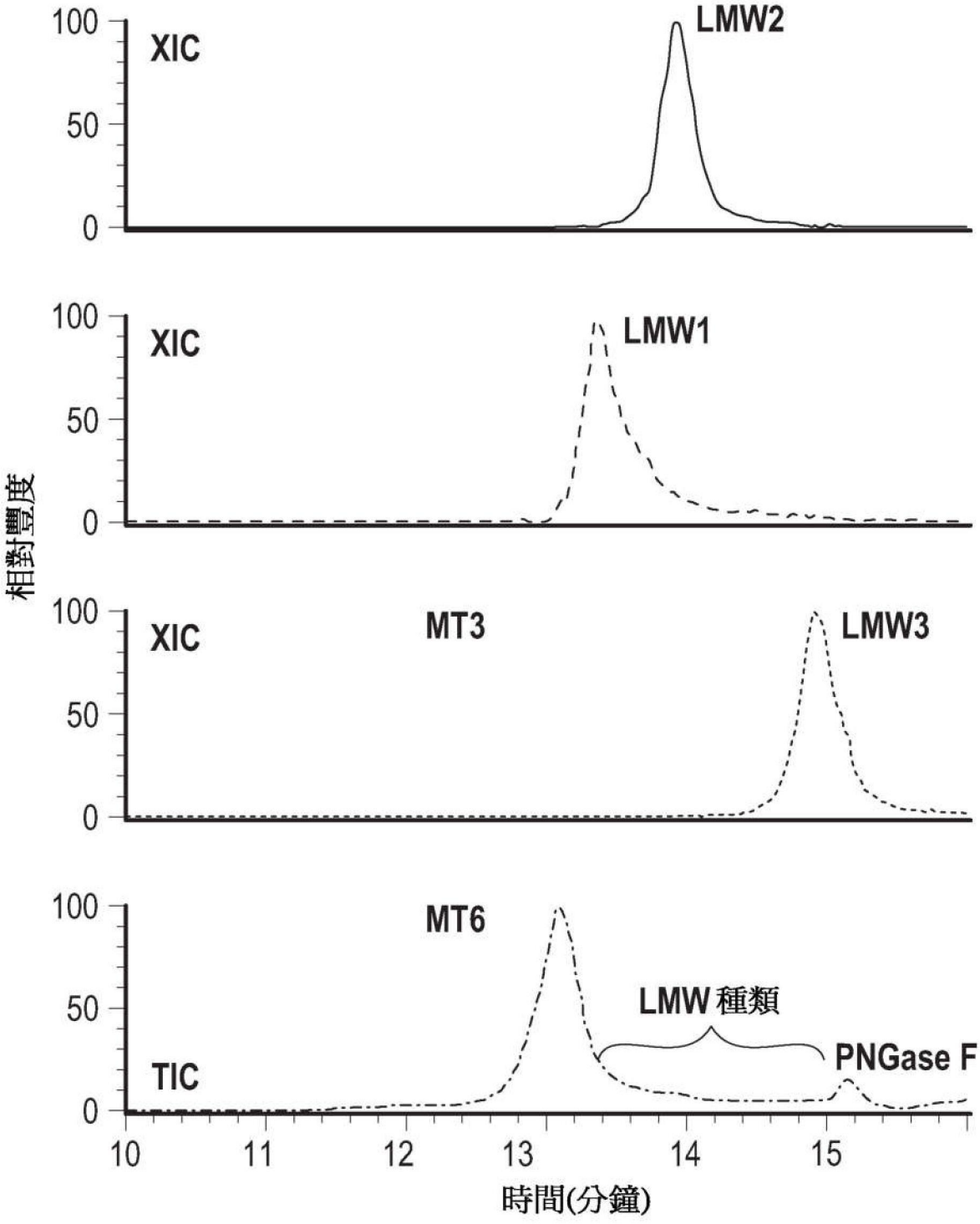
【圖 45B】


TIC
MT1
FabRICATOR 酶
相對豐度
時間(分鐘)
100
80
60
40
20
0
10
11
12
13
14
15
16

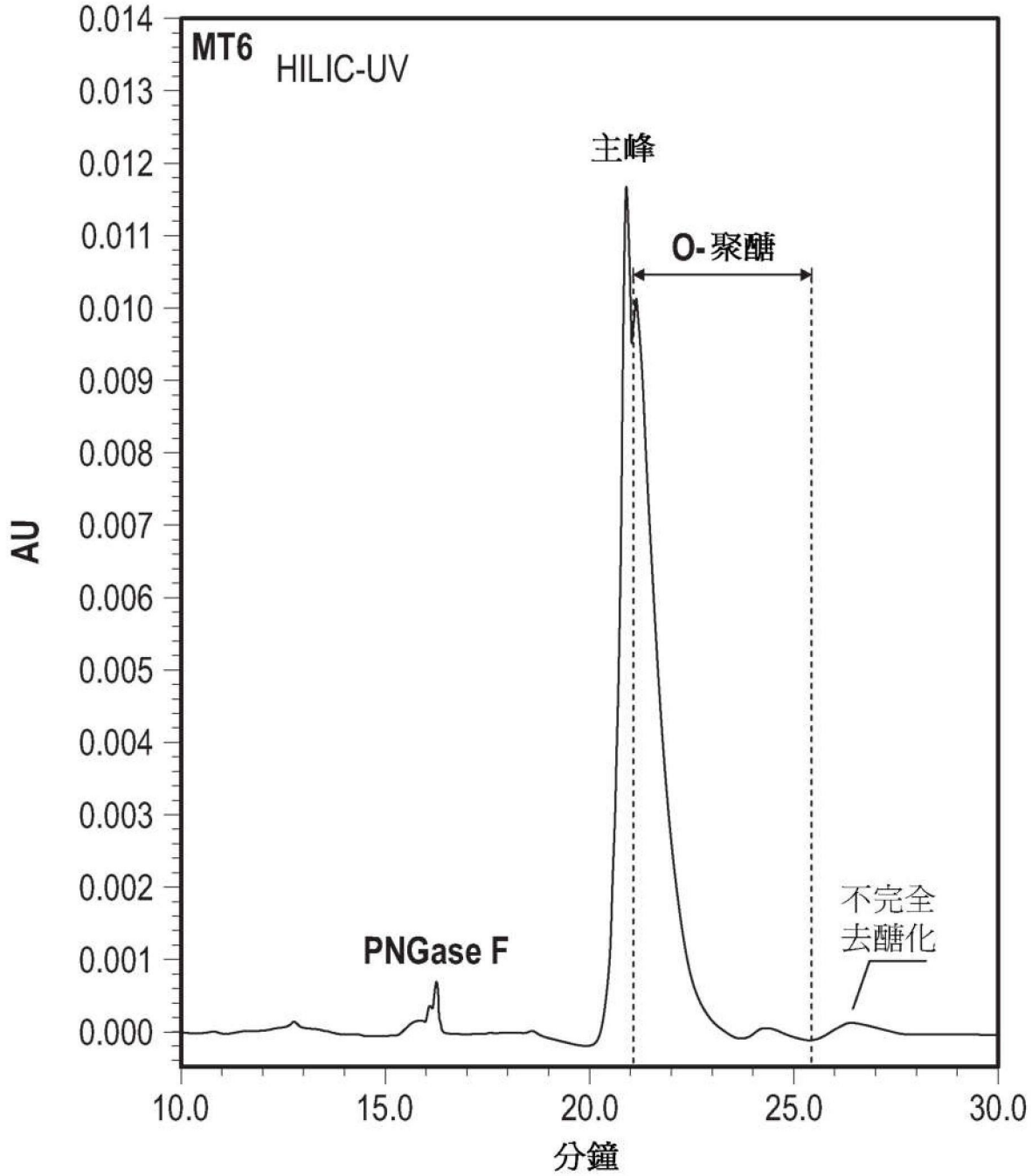
【圖 46】


100
XIC
50
0
LMW2
100
XIC
50
0
LMW1
相對豐度
100
TIC
MT5
50
LMW種類
PNGase F
0
10
11
12
13
14
15
時間(分鐘)

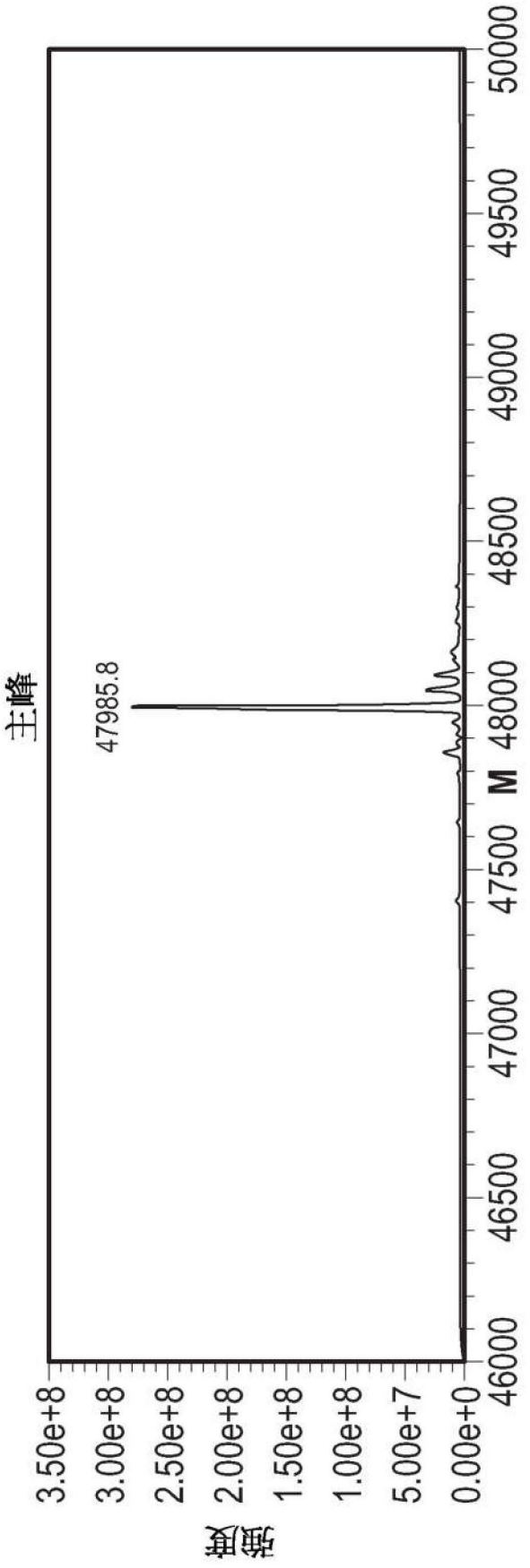
【圖 47】


100
XIC
LMW2
50
0
100
XIC
LMW1
50
0
相對豐度
100
XIC
MT3
LMW3
50
0
100
MT6
LMW 種類
PNGase F
50
TIC
0
10
11
12
13
14
15
時間(分鐘)

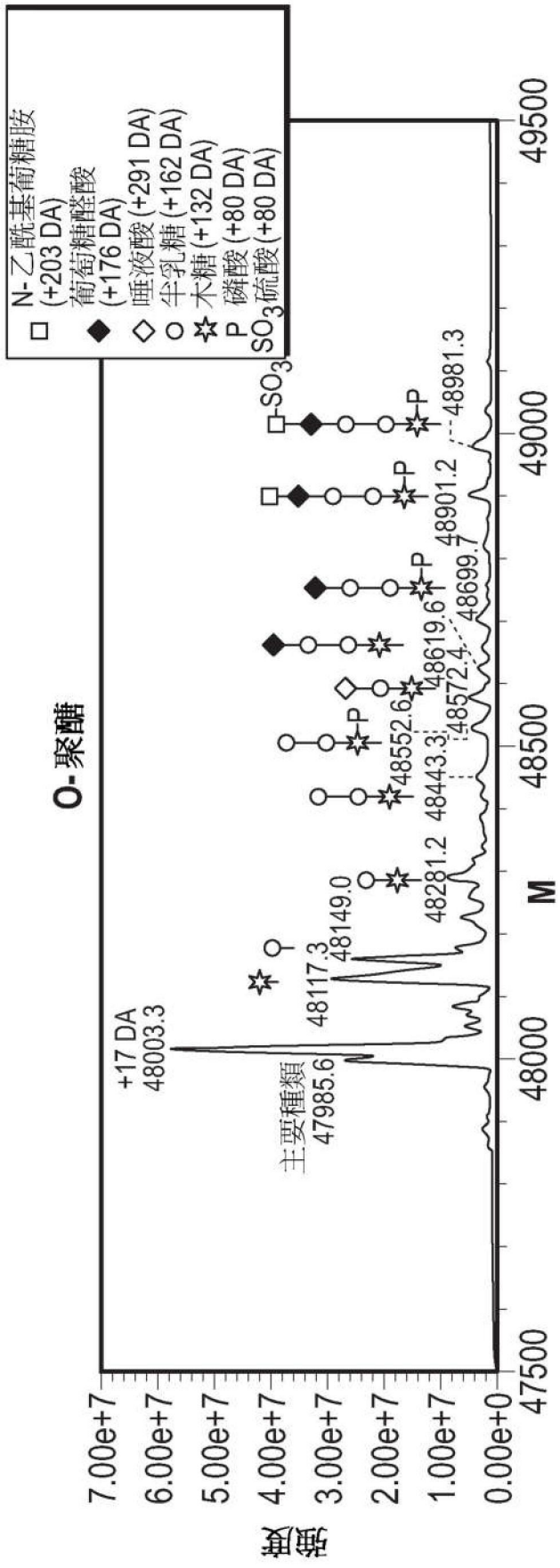
【圖 48】


MT6
HILIC-UV
主峰
O-聚醣
不完全
去醣化
PNGase F
AU
0.014
0.013
0.012
0.011
0.010
0.009
0.008
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
分鐘

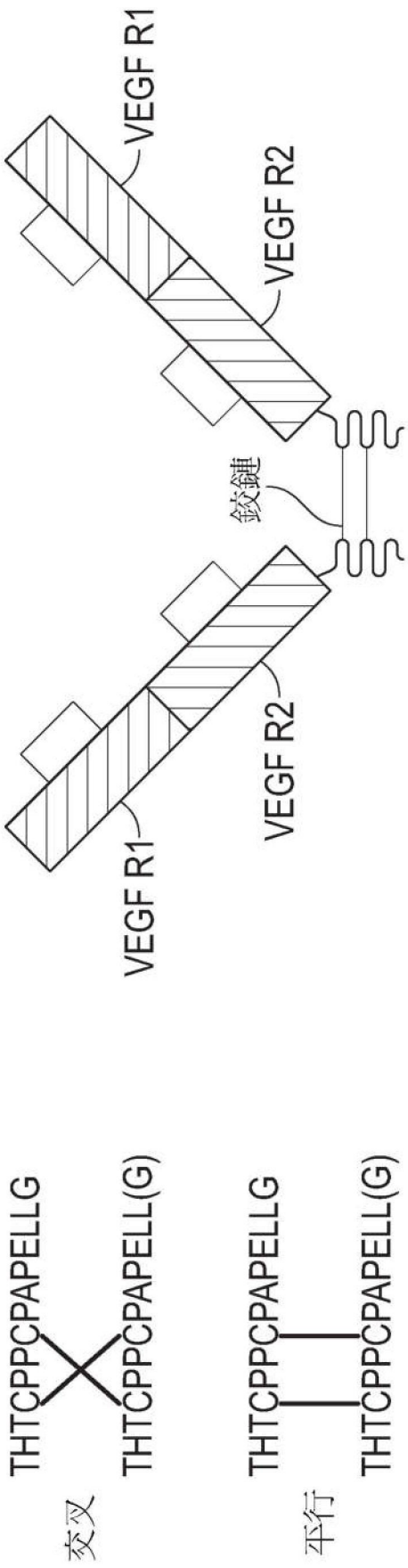
【圖 49A】


主峰
47985.8
M
強度
3.50e+8
3.00e+8
2.50e+8
2.00e+8
1.50e+8
1.00e+8
5.00e+7
0.00e+0
46000
46500
47000
47500
48000
48500
49000
49500
50000

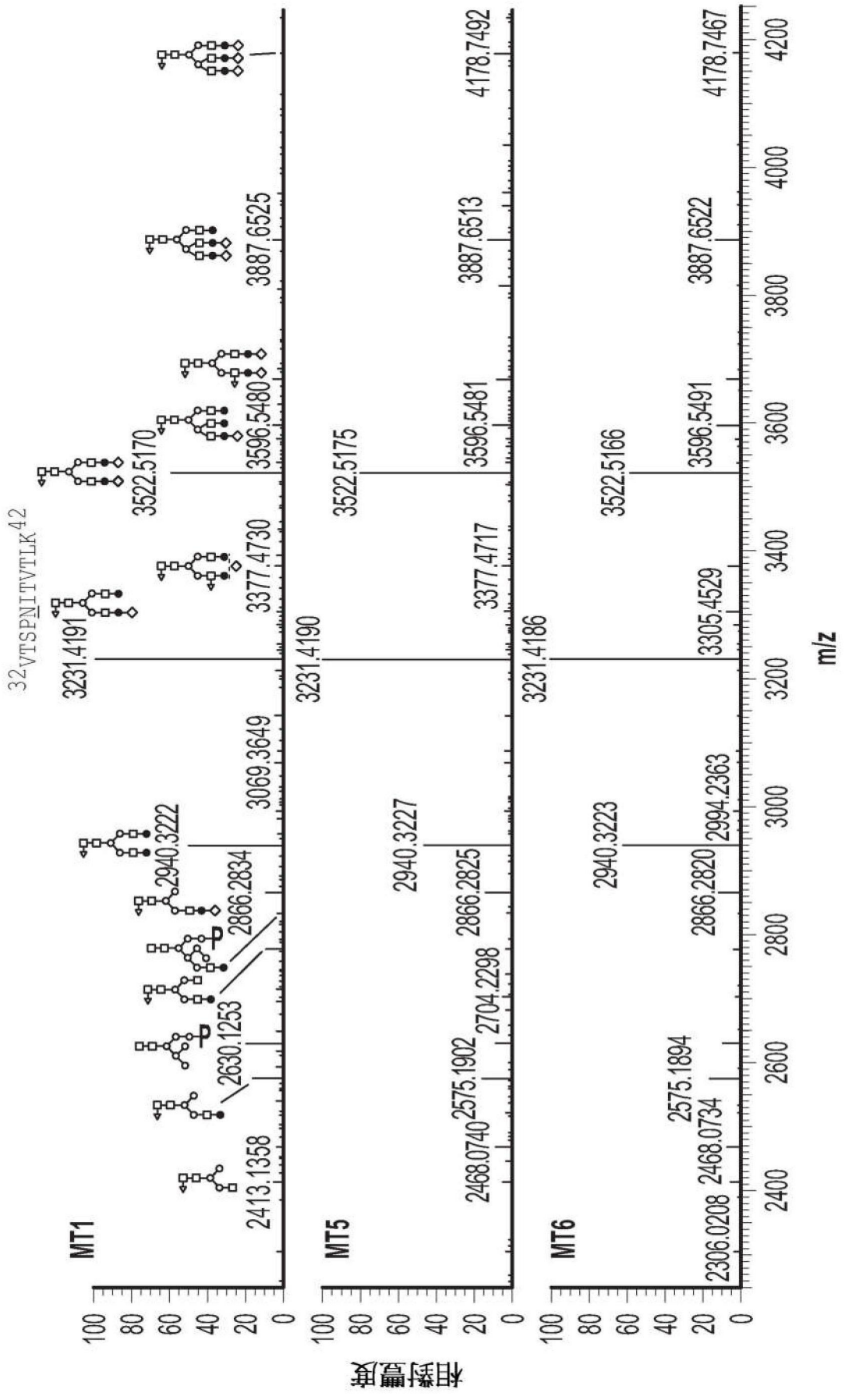
【圖 49B】


N-乙醯基葡糖胺 (+203 DA)
葡萄糖醛酸 (+176 DA)
唾液酸 (+291 DA)
半乳糖 (+132 DA)
木糖 (+132 DA)
P 磷酸 (+80 DA)
SO_3硫酸 (+80 DA)
O-聚醣
+17 DA
48003.3
主要種類
47985.6
48117.3
48149.0
48281.2
48443.3
48552.6
48572.4
48619.6
48699.7
48901.2
48981.3
M
強度
7.00e+7
6.00e+7
5.00e+7
4.00e+7
3.00e+7
2.00e+7
1.00e+7
0.00e+0
47500
48000
48500
49000
49500

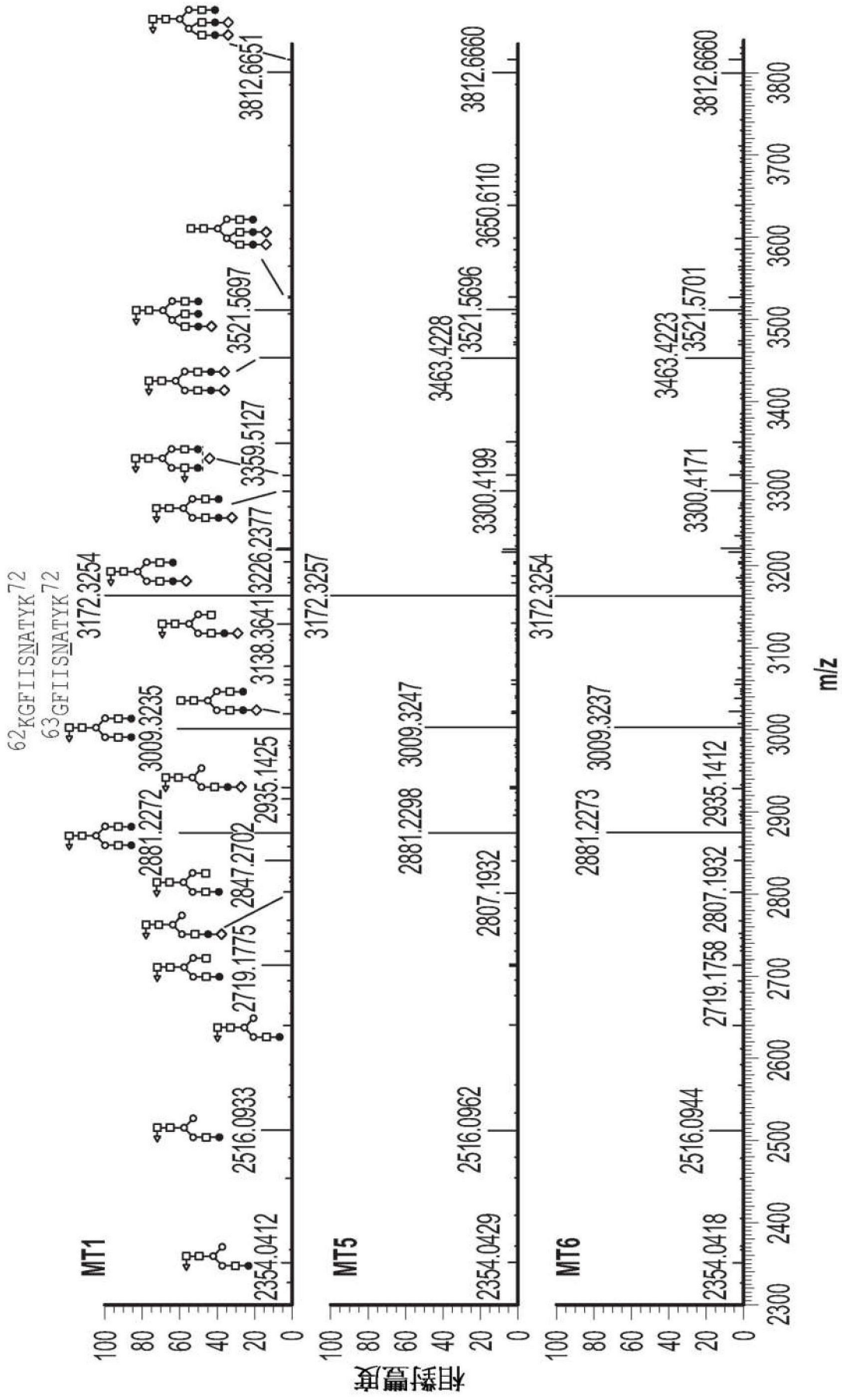
【圖 49C】


VEGF R1
VEGF R2
鉸鏈
VEGF R2
VEGF R1
THTCPPCPAPELLG
THTCPPCPAPELL(G)
交叉
THTCPPCPAPELLG
THTCPPCPAPELL(G)
平行

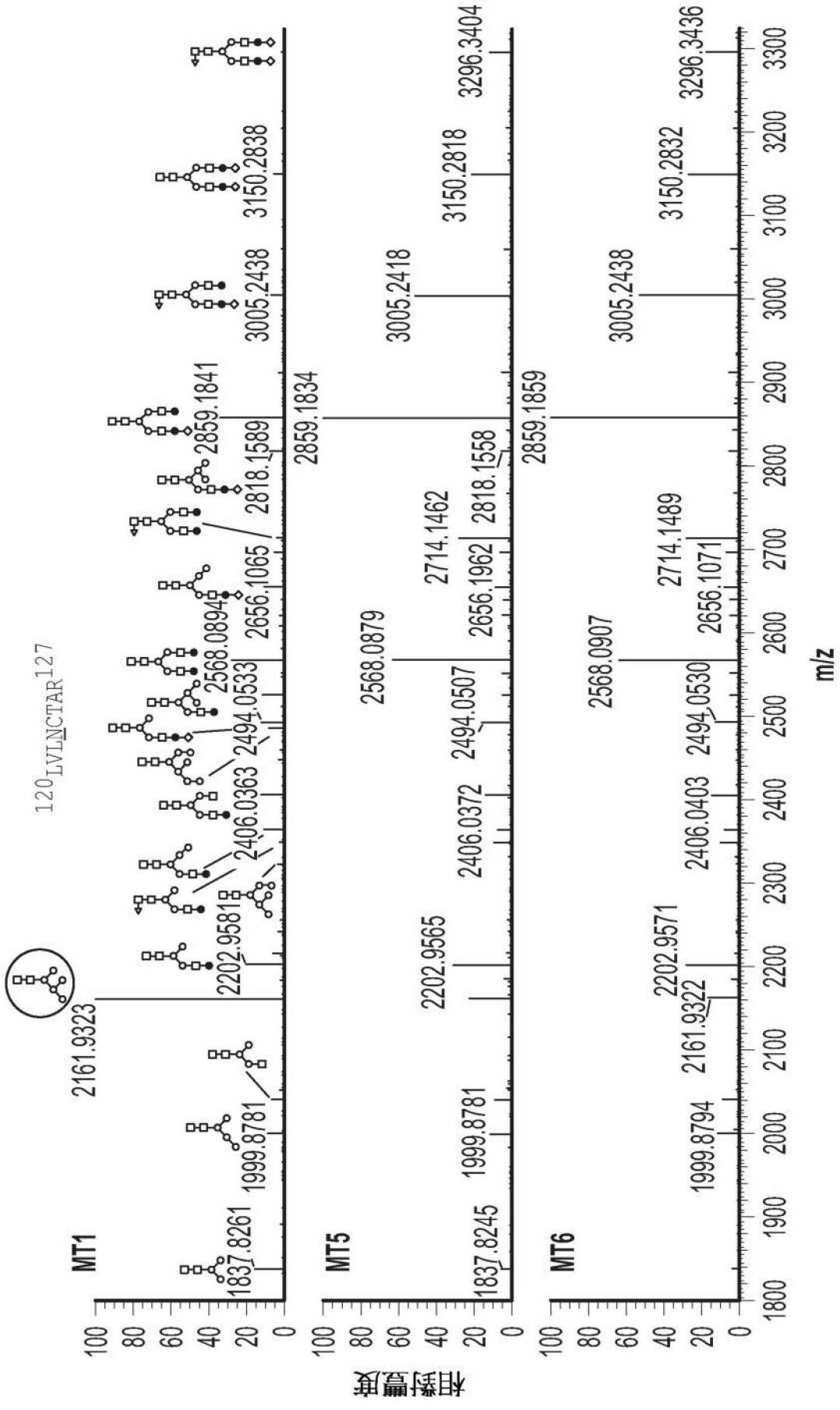
【圖 50】


32VTSPNITVTLK42
MT1
MT5
MT6
相對豐度
m/z
3231.4191
3522.5170
3596.5480
3377.4730
3887.6525
3069.3649
2940.3222
2866.2834
2630.1253
2413.1358
3231.4190
3522.5175
3596.5481
3377.4717
3887.6513
4178.7492
2940.3227
2866.2825
2704.2298
2575.1902
2468.0740
3231.4186
3522.5166
3596.5491
3305.4529
3887.6522
4178.7467
2940.3223
2994.2363
2866.2820
2575.1894
2468.0734
2306.0208
100
80
60
40
20
0
2400
2600
2800
3000
3200
3400
3600
3800
4000
4200

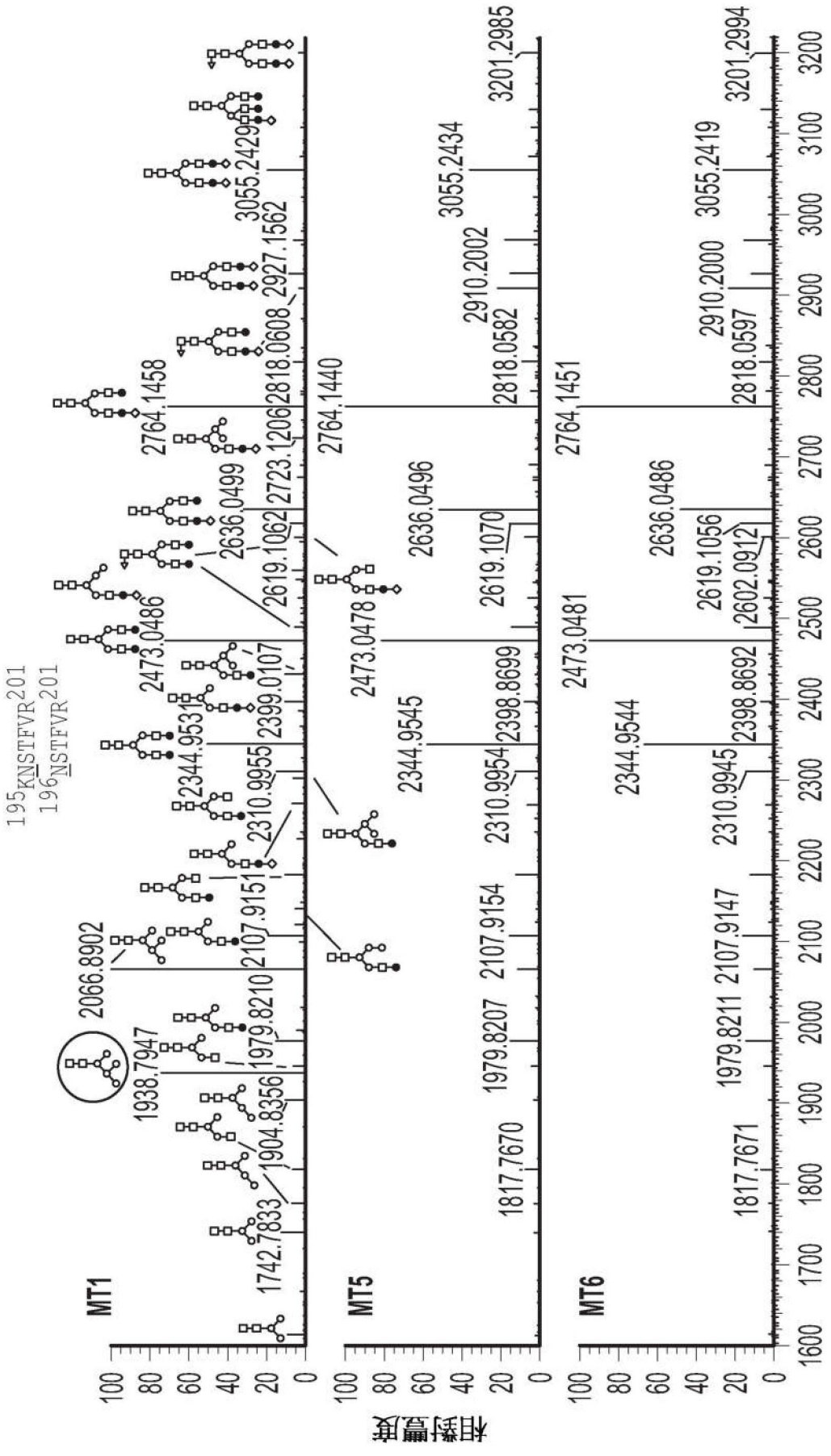
【圖 51】


62KGFIISNATYK72
63GFIISNATYK72
MT1
MT5
MT6
相對豐度
m/z
2354.0412
2516.0933
2719.1775
2847.2702
2881.2272
2935.1425
3009.3235
3138.3641
3172.3254
3226.2377
3359.5127
3521.5697
3812.6651
2354.0429
2516.0962
2807.1932
2881.2298
3009.3247
3172.3257
3300.4199
3463.4228
3521.5696
3650.6110
3812.6660
2354.0418
2516.0944
2719.1758
2807.1932
2881.2273
2935.1412
3009.3237
3172.3254
3300.4171
3463.4223
3521.5701
3812.6660

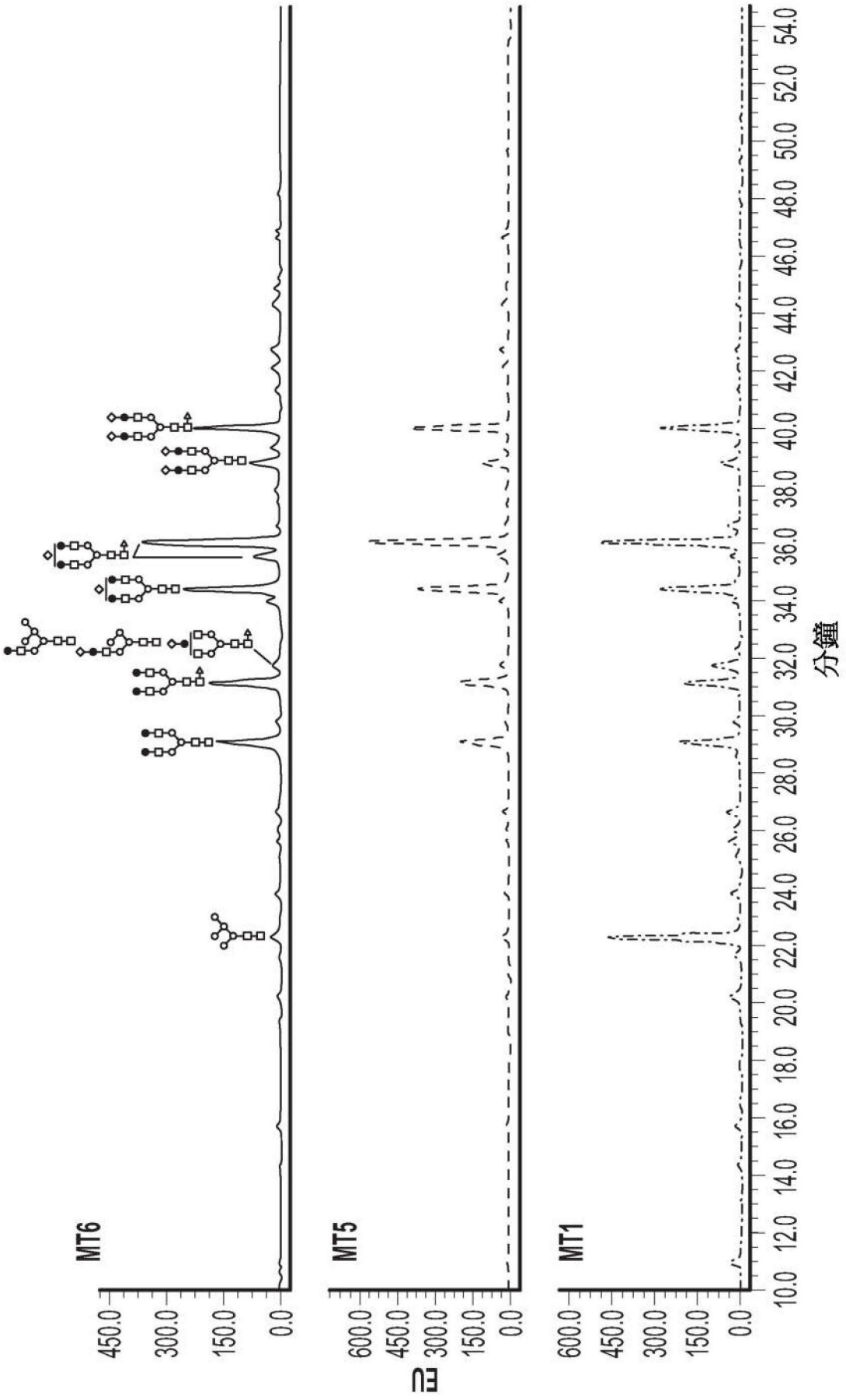
【圖 52】


120LVLNCTAR127
MT1
MT5
MT6
相對豐度
m/z
2161.9323
1837.8261
1999.8781
2202.9581
2406.0363
2494.0533
2568.0894
2656.1065
2818.1589
2859.1841
3005.2438
3150.2838
2859.1834
2568.0879
2714.1462
2818.1558
3005.2418
3150.2818
3296.3404
2859.1859
2568.0907
2714.1489
3005.2438
3150.2832
3296.3436
2202.9565
2406.0372
2494.0507
2656.1962
1999.8781
1837.8245
2202.9571
2406.0403
2494.0530
2656.1071
2161.9322
1999.8794
0
20
40
60
80
100
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
2500
2600
2700
2800
2900
3000
3100
3200
3300

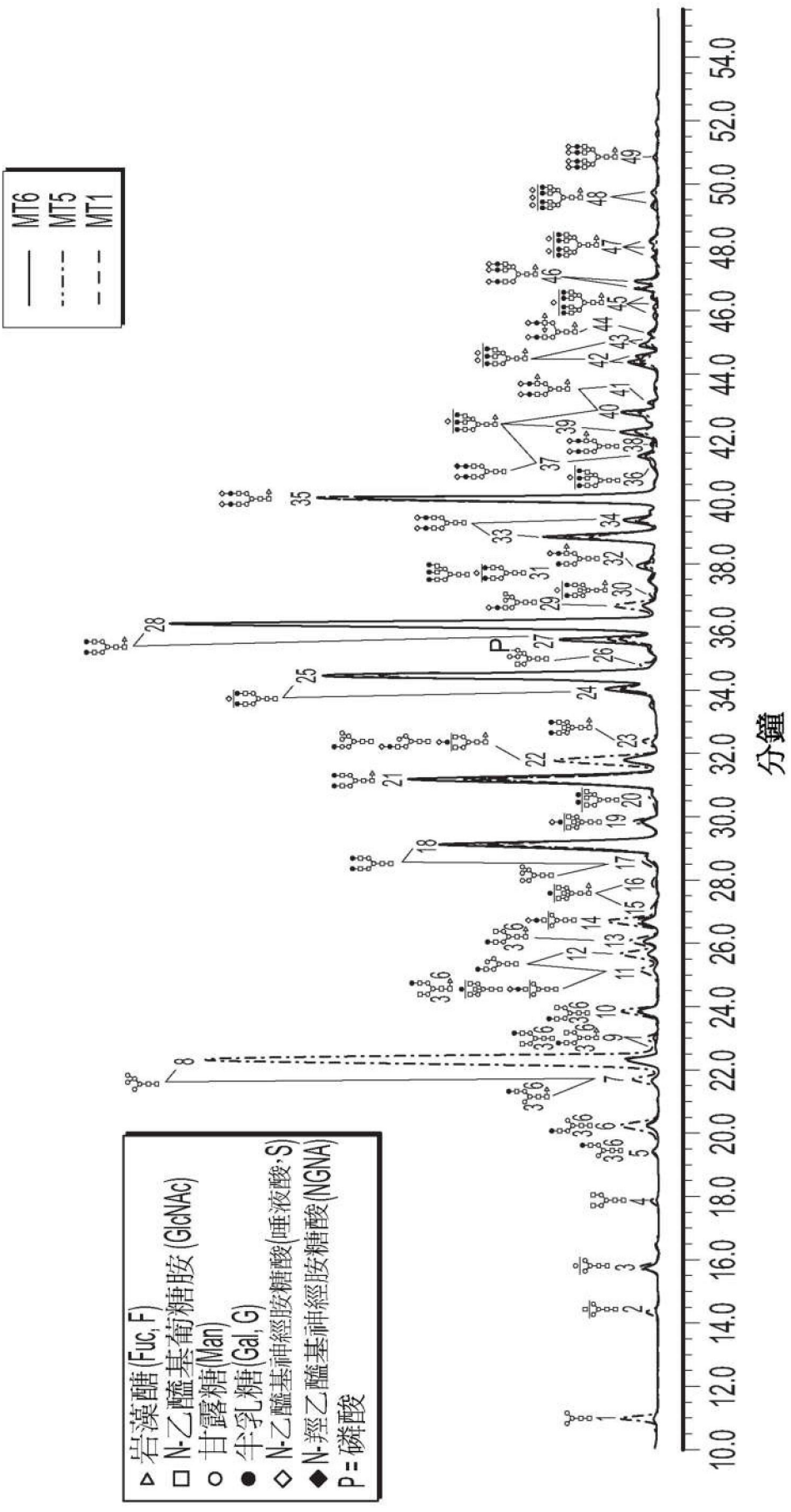
【圖 53】


195KNSTFVR201
196NSTFVR201
MT1
MT5
MT6
相對豐度
2066.8902
1938.7947
1979.8210
2107.9151
1904.8356
1742.7833
2310.9955
2344.9531
2399.0107
2473.0486
2619.1062
2636.0499
2723.1206
2764.1458
2818.0608
2927.1562
3055.2429
1979.8207
2107.9154
1817.7670
2310.9954
2344.9545
2398.8699
2473.0478
2619.1070
2636.0496
2764.1440
2818.0582
2910.2002
3055.2434
3201.2985
1979.8211
2107.9147
1817.7671
2310.9945
2344.9544
2398.8692
2473.0481
2602.0912
2619.1056
2636.0486
2764.1451
2818.0597
2910.2000
3055.2419
3201.2994

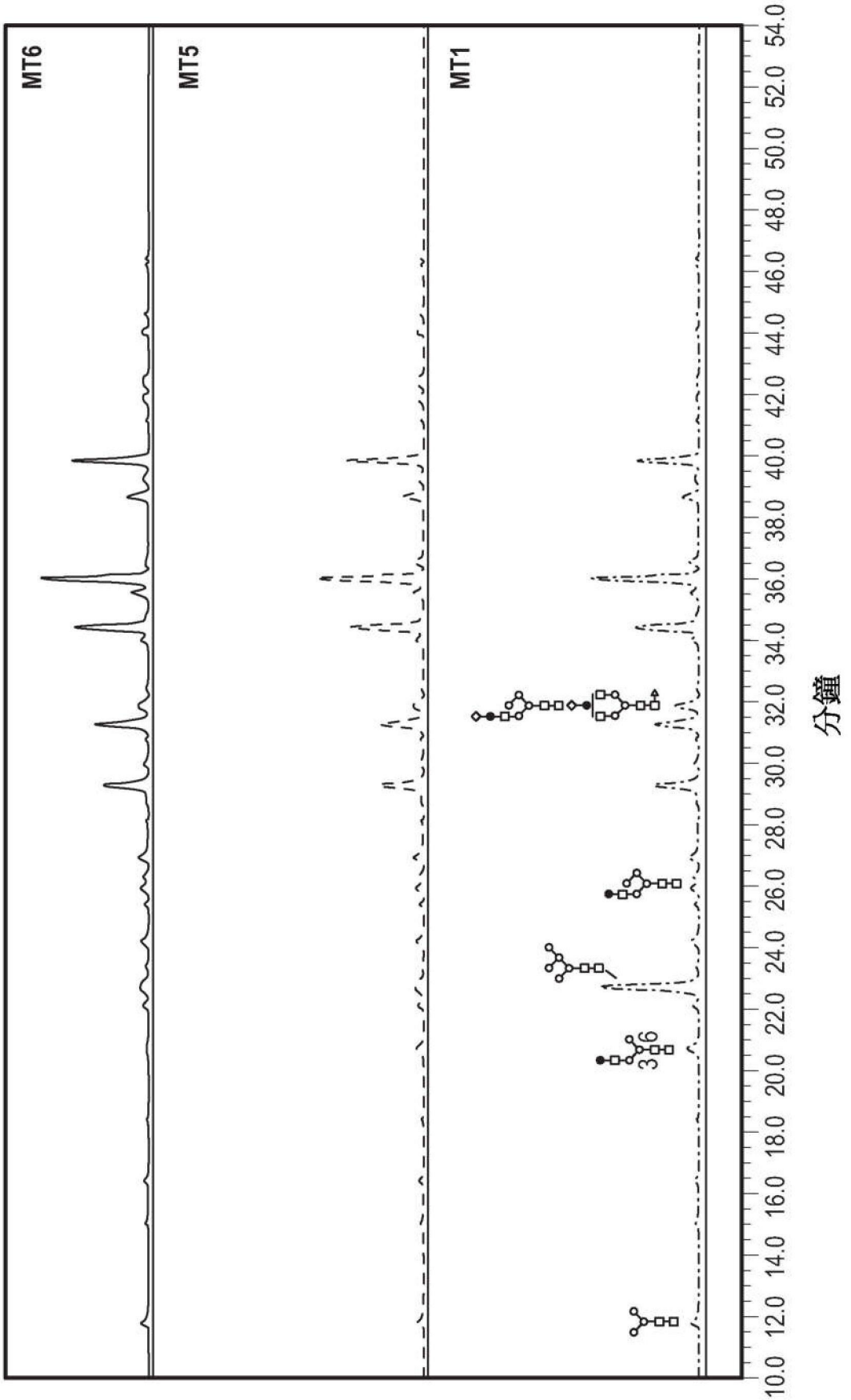
【圖 54】


MT6
MT5
MT1
450.0
300.0
150.0
0.0
600.0
450.0
300.0
150.0
0.0
600.0
450.0
300.0
150.0
0.0
10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0 36.0 38.0 40.0 42.0 44.0 46.0 48.0 50.0 52.0 54.0
分鐘
EU

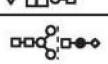
【圖 55】


MT6
MT5
MT1
▵ 岩藻醣 (Fuc, F)
□ N-乙醯基葡糖胺 (GlcNAc)
○ 甘露糖(Man)
● 半乳糖 (Gal, G)
◇ N-乙醯基神經胺糖酸(唾液酸, S)
◆ N-羥乙醯基神經胺糖酸(NGNA)
P = 磷酸
分鐘
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
26.0
28.0
30.0
32.0
34.0
36.0
38.0
40.0
42.0
44.0
46.0
48.0
50.0
52.0
54.0

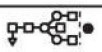
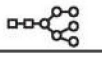
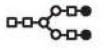
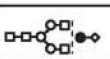
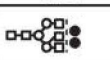
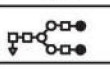
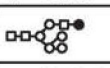
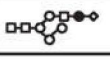
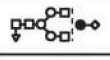
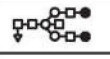
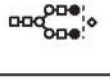
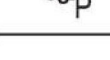
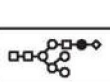
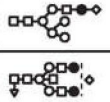
【圖 56】


MT6
MT5
MT1
3
6
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
26.0
28.0
30.0
32.0
34.0
36.0
38.0
40.0
42.0
44.0
46.0
48.0
50.0
52.0
54.0
分鐘

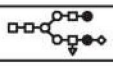
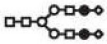
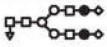
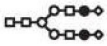
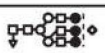
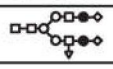
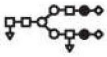
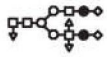
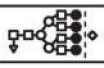
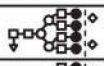
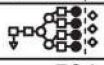
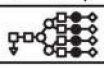
【圖 57】

峰編號	縮寫	聚醣結構	峰面積%			理論質量 (Da)
			MT6	MT5	MT1	
1	G0-2GlcNAc		0.11	0.19	0.96	1221.50
2	G0-GlcNAc		0.09	0.11	0.34	1424.58
3	Man4		0.51	0.56	0.62	1383.56
4	G0		0.07	0.05	0.26	1627.66
5	G1-GlcNAc (1-6)		0.26	0.31	0.14	1586.63
6	G1-GlcNAc (1-3)		0.55	0.61	1.76	1586.63
7	G1F-GlcNAc (1-6)		0.34	0.37	0.92	1732.69
8	Man5		1.32	1.63	16.11	1545.61
9	G1F-GlcNAc (1-3)		0.35	0.26	0.45	1732.69
	G1 (1-6)					1789.71
10	G1 (1-3)		0.89	0.88	1.34	1789.71
11	bG1		0.26	0.22	0.78	1992.79
	G1S1-GlcNAc					1877.73
	G1F (1-6)					1935.77
12	Man4_G1		0.51	0.46	1.53	1748.69
13	G1F (1-3)		0.67	0.64	1.11	1935.77
14	G1S1-GlcNAc		0.73	1.20	1.86	1877.73
15	bG1F		0.00	0.00	0.32	2138.85

【圖 58A】

峰編號	縮寫	聚醣結構	峰面積%			理論質量 (Da)
			MT6	MT5	MT1	
16	bG1F		0.00	0.00	0.40	2138.85
17	Man6		0.51	0.41	0.85	1707.66
17	G2					1951.77
18			9.95	8.85	7.96	
19	G1S1-GlcNAc		0.84	0.89	1.04	2080.81
20	G2+GlcNAc		0.28	0.28	0.57	2154.85
21	G2F		11.24	9.13	7.47	2097.82
22	Man5_G1		1.61	1.82	4.13	1910.74
22	Man4_G1S1					2039.78
22	G1FS1					2226.87
23	bG2F		0.27	0.32	0.66	2300.90
24	G2S1+Fuc		2.63	2.13	1.75	2242.86
25			13.42	14.46	9.50	
26	Man6_G0+Phos		0.00	0.00	0.53	1787.63
27	G2FS1		4.00	2.43	1.67	2388.92
28			18.85	21.19	15.94	2388.92
29	Man5_G1S1		0.51	0.62	1.70	2201.84
30	bG2FS1		0.00	0.00	0.27	2592.00
31	G2+NGNA		0.44	0.35	0.35	2258.86
31	G3					2316.90

【圖 58B】

峰編號	縮寫	聚醣結構	峰面積%			理論質量(Da)
			MT6	MT5	MT1	
32	G2S1+Fuc		0.85	0.59	0.38	2388.92
33	G2S2		4.56	4.36	2.57	2533.96
34			1.31	0.99	0.71	2533.96
35	G2FS2		10.76	13.67	8.33	2680.02
36	G3S1		0.20	0.14	0.11	2607.99
37	G2S1+NGNA		0.87	0.59	0.35	2549.95
	G3FS1					2754.05
38	G2S2+Fuc		0.23	0.13	0.07	2680.02
39	G3FS1		1.61	1.22	0.67	2754.05
40	G2FS2+Fuc		1.77	1.77	0.95	2754.05
						2826.07
41			0.24	0.24	0.15	
42	G3FS2		1.85	1.59	0.77	3045.15
43			0.78	0.77	0.32	
44	G2FS2+2Fuc		0.34	0.31	0.14	2972.13
45	G4FS1		0.57	0.29	0.12	3119.18
46	G3FS3		1.14	1.43	0.58	3336.24
47	G4FS2		0.89	0.72	0.24	3410.28
48	G4FS3		0.63	0.60	0.18	3701.38
49	G4FS4		0.22	0.23	0.07	3992.47

【圖 58C】


生物反應器
藉由直接深度過濾之收穫
親和捕獲及過濾
酶切割
親和流通
親和流通後超濾(PAFTUF)
病毒滅活(VI)及過濾
陰離子交換層析(AEX)
疏水相互作用層析(HIC)
病毒滯留過濾(VRF)
超濾及滲濾(UFDF)

【圖 59】