



(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 I850192 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：106123247

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 11 日

(51)Int. Cl. : C07K14/59 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K38/24 (2006.01)

(30)優先權：2016/07/11 美國

62/360,767

(71)申請人：以色列商歐科生物製品有限公司 (以色列) OPKO BIOLOGICS LTD. (IL)
以色列(72)發明人：海斯科維茲 歐文 HERSHKOVITZ, OREN (IL)；莫斯科維奇 羅拉
MOSCHCOVICH, LAURA (IL)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2015/368630

US 2016/0168588A1

網路文獻 Laura Moschcovich, et al., Robust Fed-Batch Manufacturing Process of Long Acting Factor VIIa (MOD-5014) in CHO Cells. WFH 2016 World Congress, Poster:130, 2016/7/24-28. https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/WFH2016/aula/-PO-T_130_WFH2016.pdf

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：22 共 198 頁

(54)名稱

長效型凝血因子及其生產方法

(57)摘要

本發明揭露了包括有絨毛膜促性腺激素的至少一個羧基端肽(CTP)之多肽以及編碼該多肽之聚核苷酸，所述 CTP 連接至凝血因子的羧基端，但是沒有連接至凝血因子的胺基端。還揭露了包括有本發明之多肽與聚核苷酸的醫藥組合物與醫藥調配物，以及其使用與生產方法。

Polypeptides comprising at least one carboxy-terminal peptide (CTP) of chorionic gonadotropin attached to the carboxy terminus but not to the amino terminus of a coagulation factor and polynucleotides encoding the same are disclosed. Pharmaceutical compositions and pharmaceutical formulations comprising the polypeptides and polynucleotides of the disclosure and methods of using and producing same are also disclosed.

指定代表圖：

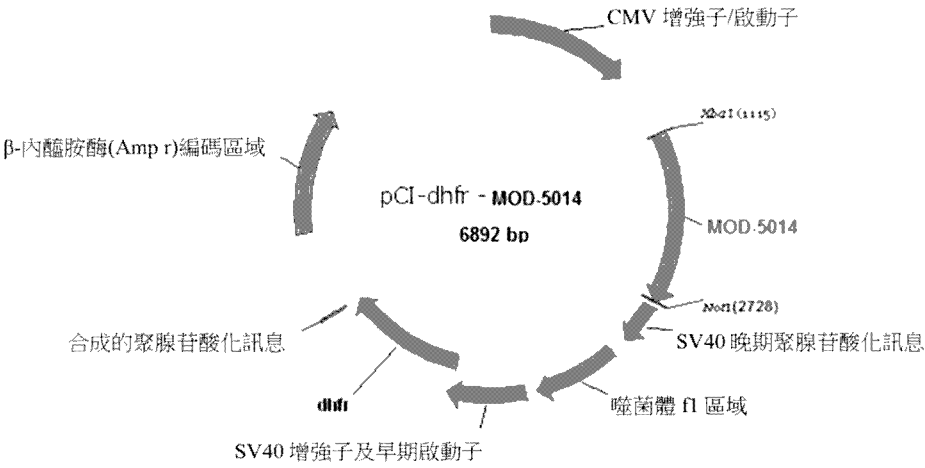


圖 1

I850192

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC分類：

【發明名稱】（中文/英文）

長效型凝血因子及其生產方法

LONG-ACTING COAGULATION FACTORS AND METHODS OF
PRODUCING SAME

【中文】

本發明揭露了包括有絨毛膜促性腺激素的至少一個羧基端肽(CTP)之多肽以及編碼該多肽之聚核苷酸，所述 CTP 連接至凝血因子的羧基端，但是沒有連接至凝血因子的胺基端。還揭露了包括有本發明之多肽與聚核苷酸的醫藥組合物與醫藥調配物，以及其使用與生產方法。

【英文】

Polypeptides comprising at least one carboxy-terminal peptide (CTP) of chorionic gonadotropin attached to the carboxy terminus but not to the amino terminus of a coagulation factor and polynucleotides encoding the same are disclosed. Pharmaceutical compositions and pharmaceutical formulations comprising the polypeptides and polynucleotides of the disclosure and methods of using and producing same are also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

長效型凝血因子及其生產方法

LONG-ACTING COAGULATION FACTORS AND METHODS OF PRODUCING SAME

【技術領域】

【001】 本發明揭露了包括有與凝血因子羧基端連接的絨毛膜促性腺激素的至少一個羧基端肽(CTP)之多肽及編碼所述多肽的聚核苷酸。本發明亦揭露了包括有本發明的多肽與聚核苷酸之醫藥組合物與醫藥調配物及其使用與生產方法。

【先前技術】

【002】 凝血因子替代療法的發展已經改變了許多具有血友病的個體的生活。血友病是一群削弱身體控制血液凝結或凝血的能力之遺傳性基因障礙。具有血友病的患者不會產生足夠量的有效血液凝固所必需的因子 VIII 或因子 IX 蛋白。在嚴重的血友病患者中，即使是微小外傷都可導致持續數天或數週的失血，並且可能不會完全癒合，從而導致對關節和其它器官產生虛弱性永久傷害的可能性且過早死亡。

【003】 血友病是由凝血級聯中的缺陷或不存有在關鍵因子所引起的遺傳性 X 染色體連鎖性出血性疾病。在血友病患者中，凝血酶的生成及纖維蛋白凝塊形成係嚴重受損，導致在關節和內臟器官中最常見的自發性出血事件，以及手術或創傷期間及之後的過度出血。頻繁出血也可在血友病患者中引起關節腫脹、關節損傷、嚴重畸形、頻繁感染及流動性降低 (Mayo Clinic)。A 型血友病係由因子 VIII 的表現缺陷或缺乏所引起，而 B 型血友病 B 是由因子 IX 的表現缺陷或缺乏所引起。

【004】 血友病 B 型係導致 FIX 的促凝活性的缺乏。血友病 B 型患者

具有自發的軟組織出血和反復的關節積血，經常導致摧毀性的關節病。這些患者的目前治療方法包含靜脈內施用重組 FIX。然而，FIX 的成本問題及在血液循環中相對快速的排除問題使得開發長效型 FIX 成為一項挑戰性的任務。FVIII 和 FIX 的商業可得性已導致對危及生命的出血發作的改善控制。許多患者接受了預防性療法，這會降低出血與其相關併發症的風險。然而，高比例的患者(10-30%)會發展出針對外源性施用的 FVIII 與 FIX 之抑制性抗體。FVIIa（其為一種旁路產物）的施用係可誘導體內穩態並對具有抑制性 Ab 的患者提供有效的治療。

【005】 重組 FVIIa (NovoSeven®)為市售可得的，並且在 1996 年被批准用於治療具有抑制劑的血友病患者中的出血發作。但是，rFVIIa 以 2.5 小時的終末半衰期被快速地清除。所以，患者通常需要多次頻繁輸注(以 2-3 小時間隔施用 2-3 劑)以在輕度至中度出血後達到足夠的體內穩態。結果，在開發長效形式的 FVIIa 中存在許多興趣，所述長效形式的 FVIIa 會延長單次劑量以後止血活性的持續時間並允許頻率低得多的給藥。長效 FVIIa 也會增加長期預防性療法的可行性。

【006】 正在開發用於延長 FVIIa 的半衰期的各種技術。然而，仍有實現延長該蛋白的半衰期之需求，同時保留它的生物活性並確保該等修飾不會誘導顯著的免疫原性。本發明藉由將促性腺激素羧基端肽(CTPs)連接到 FVIIa 而解決了此需求，藉以修飾 FVIIa 以延長其半衰期及生物活性。

【發明內容】

【007】 在一態樣中，本發明所揭露的是一種製造人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類因子 VII (FVII)多肽之方法，其中該多肽包括三個以串聯方式連接至 FVII 的 C 端之 CTP 分子，該方法包括以下步驟：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液

中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及，從該澄清採集溶液純化所述多肽，以取得一個具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVII 之純化蛋白溶液；藉以製造 CTP 修飾的 FVII，其中所製造之 CTP 修飾的 FVII 的胺基酸序列係陳述於 SEQ ID NO: 7 中。

【008】 在一態樣中，本發明所揭露的是一種製造人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVII)多肽之方法，其中該多肽包括三個以串聯方式連接至 FVII 的 C 端之 CTP 分子，該方法包括以下步驟：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及，從該澄清採集溶液純化並活化所述多肽，以取得所述具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVIIa 之純化蛋白溶液；藉以製造 CTP 修飾的 FVIIa，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 的胺基酸序列係陳述於 SEQ ID NO: 7 中。

【009】 在另一態樣中，本發明所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類因子 VII (FVII)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVII 的 C 端之 CTP 分子，其中所述 CTP 修飾的因子 FVII 係藉由一種包括以下步驟之方法所製造：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及從該澄清採集溶液純化所述多肽，以取得一個具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVII 之純化蛋白溶液，其中所製造之 CTP 修飾的 FVII 係

包括陳述於 SEQ ID NO: 7 中的胺基酸序列。

【010】 在另一態樣中，本發明所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活化因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVII 的 C 端之 CTP 分子，其中所述 CTP 修飾的因子 FVIIa 係藉由一種包括以下步驟之方法所製造：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及從該澄清採集溶液純化並活化所述多肽，以取得一個具有所期望濃度之 CTP 修飾的 FVIIa 之純化蛋白溶液，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 係包括陳述於 SEQ ID NO: 7 中的胺基酸序列。

【011】 在一相關的態樣中，所製造之人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活化因子 VII (FVII)多肽為高度醣基化的。在另一相關的態樣中，各個 CTP 所製造之 CTP 修飾的 FVII 之醣基化模式係包括在至少 4 個 O 鍵聯的醣基化位點處之醣基化。在另一相關的態樣中，所述 CTP 修飾的 FVII 係包括高比例之帶電荷的 N 型醣鏈(N-glycans)。在另一相關的態樣中，所製造之人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活化因子 VII (FVII)多肽為高度唾液酸化的。

【012】 在一相關的態樣中，所製造之人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活化因子 VII (FVII) 多肽係包括高比例的羧化麩胺酸殘基。

【013】 在一相關的態樣中，細胞株的擴增係包括擴增取自一工作細胞庫(WCB)或取自一主細胞庫(MCB)之細胞株。在另一相關的態樣中，所述細胞株係以至少 600 mg/L 之量表現及分泌 CTP 修飾的 FVII。在另一相關的態樣中，所述細胞株係通過一系列的繼代培養步驟來達到生物反應器程度而在溶液中擴增。在另一相關的態樣中，生物反應器係包括一拋棄式生

物反應器或一不銹鋼生物反應器。在另一相關的態樣中，該生物反應器係以做為一批次饋料模式的生物反應器而運行。

【014】 在一相關的態樣中，至少 60%之從該澄清採集液純化的人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽係包括高度醣基化形式之 CTP 修飾的 FVII。在一相關的態樣中，至少 60%之從該澄清採集液純化的人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽係包括高比例的羧化麩胺酸殘基。

【015】 在一相關的態樣中，純化係包括依序執行以下步驟，包括使該澄清採集液通過親和性管柱、複合模式或混合模式管柱、疏水性作用管柱及陰離子交換管柱；使存在於澄清採集液中的病毒、或者在任何所述管柱層析之後的溶析收集液中的病毒去活化，其中病毒的去活化係包括在對該病毒有毒性的溶液中培養或進行奈米過濾，或其任何組合；且其中該陰離子交換溶析液係經受一超微過濾/滲濾步驟。

【016】 在一相關的態樣中，所製造之 CTP 修飾的人類因子 VII (FVII)多肽係包括具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽（CTP 修飾的 FVIIa 多肽）。

【017】 在一相關的態樣中，該製造方法係達到至少 20%回收率之高度醣基化的 CTP 修飾的 FVII。

【018】 在另一態樣中，一種組合物係包括所製造之 CTP 修飾的 FVII，及一醫藥上可接受的載體。

【019】 在另一態樣中，本文中所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 高效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【020】 在一相關態樣中，所述高唾液酸含量係由至少 15 mol/mol 所組成。在另一相關態樣中，該高度醣基化形式係包括至少 10 mol/mol 的 O 型醣鏈含量。在另一相關態樣中，實質純質及活性形式係包括至少 60% 之高度醣基化形式之活性 CTP 修飾的 FVIIa。在另一相關態樣中，至少 60% 之所述實質純質與 CTP 修飾的 FVIIa 形式係包括高比例的羧化麩胺酸(Gla)殘基。在另一相關態樣中，所述高比例的羧化麩胺酸(Gla)殘基係由至少 90% 的 Gla 殘基組成。在另一相關態樣中，所述低比例的氧化形式係由少於 5% 所組成。在另一相關態樣中，所述實質純質與活性 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度為至少 90%。在一另外的相關態樣中，該純度百分比係選自由已下組成之群：97.3%、97.6%、97.4% 及 97.0%。在另一相關態樣中，所述實質純質與活性 CTP 修飾的 FVII 多肽之效價為 10,500 U/mg。在一另外的相關態樣中，該效價係選自由以下組成之群：15,563 U/mg、16,720 U/mg、22,478 U/mg 及 23,608 U/mg。

【021】 在另一態樣中，本文中所揭露的是一種包括有所述 CTP 修飾的 FVIIa 以及一醫藥上可接受的載體之組合物，所述 CTP 修飾的 FVIIa 係包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 高效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【022】 從下述詳細描述、實例和圖式將明白本發明的其它特徵和優點。然而，應當理解，所述詳細描述和具體實例儘管指出了本發明的較佳實施例，但是僅僅通過例證給出，因為本領域技術人員從該詳細描述會明白在本發明的精神和範圍內的各種變化和修改。

【圖式簡單說明】

【023】 本專利或申請案檔案係包括以彩色製成的至少一個附圖。帶有彩色附圖之本專利或專利申請公開的副本，專利局將在基於請求和支付必

要費用的情況下提供。

【024】 圖 1. 其顯示質體 pCI-dhfr-MOD-5014 的圖譜。

【025】 圖 2A. 其顯示 FVII-CTP₃ 純化過程的示意圖。生產了批次 31 用於 PK/PD 研究。

【026】 圖 2B. 其顯示 FVII-CTP₃ 純化過程的示意圖。生產了批次 38 用於存活研究。

【027】 圖 3A. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 10 µg (批次 31) 或 5 µg (批次 38) 裝填入考馬斯染色的 SDS-PAGE 的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。所有 3 種抗體都檢測 FVII。

【028】 圖 3B. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 10 µg (批次 31) 或 5 µg (批次 38) 裝填入考馬斯染色的 SDS-PAGE 的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。

【029】 圖 3C. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 10 µg (批次 31) 或 5 µg (批次 38) 裝填入考馬斯染色的 SDS-PAGE 的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。

【030】 圖 3D. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 10 µg (批次 31) 或 5 µg (批次 38) 裝填入考馬斯染色的 SDS-PAGE 的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。

【031】 圖 3E. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 10 µg (批次 31) 或 5 µg (批次 38) 裝填入考馬斯染色的 SDS-PAGE 的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。

【032】 圖 3F. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 1 µg 的蛋白裝填入西方墨點印跡的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。所有 3 種抗體都檢測 FVII。且以 α-FVII 偵測 FVIIa 輕鏈。

【033】 圖 3G. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 1 μ g 的蛋白裝填入西方墨點印跡的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。所有 3 種抗體都檢測 FVII。且以 α -CTP 檢測 FVIIa 重鏈。

【034】 圖 3H. 其顯示最終的 FVII 及 FVIIa 的 SDS-PAGE 與西方墨點印跡。將 1 μ g 的蛋白裝填入西方墨點印跡的每個泳道中。1. FVII-CTP₃ 多肽；2. 重鏈，包含 3x CTP；3. 輕鏈。所有 3 種抗體都檢測 FVII。且以 α -Gla 檢測 FVIIa 重鏈。

【035】 圖 4. 其顯示由於在陶瓷羥基磷灰石(HA)管柱上的純化而增強的 FVII-CTP₃ 顯色活性。使用市售可得的顯色活性測試試劑組 BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304)，進行 FVII-CTP₃ 採集液、過程中的流份及純化的 FVII-CTP₃ 相對於人類正常血漿彙集液的體外效價之比較性評估。將 FVII-CTP₃ 採集液與蛋白質連續稀釋，並藉由將劑量反應曲線與正常人類血漿的參考製劑進行比較而評估效價。

【036】 圖 5. 其顯示 FVIII-缺陷型小鼠中 FVIIa-CTP₃ 相對於 NovoSeven®的 PK 曲線。在 FVII 選擇、HA 純化過程與活化之後，產生 FVIIa-CTP₃。將 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®在單次靜脈內注射中施給 FVIII-/-血友病小鼠。在給藥後的 0.083、0.5、2、8、24、48 和 72 小時，在眼眶抽取血液樣本。在取樣後立即製備檸檬酸鹽化的血漿(0.38%)，並在分析之前在-20°C 下儲存，並使用 STACLOT 市售試劑組基於 FVIIa 凝血活性來建立 PK 曲線。

【037】 圖 6A. 其顯示在 FVII 選擇、HA 純化過程與活化以後產生 FVIIa-CTP₃。將 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®在單次靜脈內注射中施用給 FVIII-/-血友病小鼠。在給藥後的 0.083、0.5、2、8、24、48 和 72 小時在眼眶抽取血液樣本。在取樣後立即製備檸檬酸鹽化的血漿(0.38%)，並在分析之前在-20°C 下儲存。在 PK 實驗期間評估凝血酶產生參數，並評估包

含有達到峰值的最大量之參數。

【038】 圖 6B. 其顯示在 FVII 選擇、HA 純化過程與活化以後產生 FVIIa-CTP₃。將 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®在單次靜脈內注射中施用給 FVIII-/-血友病小鼠。在給藥後的 0.083、0.5、2、8、24、48 和 72 小時在眼眶抽取血液樣本。在取樣後立即製備檸檬酸鹽化的血漿(0.38%)，並在分析之前在-20°C 下儲存。在 PK 實驗期間評估凝血酶產生參數，並評估包含有達到時間點的凝血酶量之參數。

【039】 圖 6C. 其顯示在 FVII 選擇、HA 純化過程與活化以後產生 FVIIa-CTP₃。將 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®在單次靜脈內注射中施用給 FVIII-/-血友病小鼠。在給藥後的 0.083、0.5、2、8、24、48 和 72 小時在眼眶抽取血液樣本。在取樣後立即製備檸檬酸鹽化的血漿(0.38%)，並在分析之前在-20°C 下儲存。在 PK 實驗期間評估凝血酶產生參數，並評估包含有凝血酶生成速率之參數。

【040】 圖 7A. 其顯示尾靜脈橫斷(TVT)之後的血友病小鼠存活曲線。在給藥 15 分鐘之後進行 TVT。在 TVT 之後觀察小鼠存活情況 24 小時，並在前 12 個小時中的每個小時以及在 24 小時之後進行記錄。對照組資料(載體)係為三個在每個實驗中有 5 隻小鼠之實驗的總和。

【041】 圖 7B. 其顯示尾靜脈橫斷(TVT)之後的血友病小鼠存活曲線。在給藥 24 小時之後進行 TVT。在 TVT 之後觀察小鼠存活情況 24 小時，並在前 12 個小時中的每個小時以及在 24 小時之後進行記錄。對照組資料(載體)係為三個在每個實驗中有 5 隻小鼠之實驗的總和。

【042】 圖 7C. 其顯示尾靜脈橫斷(TVT)之後的血友病小鼠存活曲線。在給藥 48 小時之後進行 TVT。在 TVT 之後觀察小鼠存活情況 24 小時，並在前 12 個小時中的每個小時以及在 24 小時之後進行記錄。對照組資料(載體)係為三個在每個實驗中有 5 隻小鼠之實驗的總和。

【043】 圖 7D. 其概述在 TVT 之後記錄 24 小時的小鼠存活情況。

【044】 圖 8. 其顯示 FVIIa (NovoSeven)與 CTP 修飾的因子 VIIa (MOD-5014)之間的受質(Pefachrome FVIIa)裂解活性比較。

【045】 圖 9. 其顯示當 FVIIa (NovoSeven)與 CTP 修飾的因子 VIIa (MOD-5014)結合到組織因子時，其之間的受質(Pefachrome FVIIa)活性比較。

【046】 圖 10. 其基於因子 VIIa 的濃度來顯示通過 FVIIa (NovoSeven)或 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)而生成之經活化的因子 X 的比較。

【047】 圖 11. 其基於因子 X 的濃度來顯示通過 FVIIa (NovoSeven)或 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)而生成之經活化的因子 X 的比較。

【048】 圖 12A 及 12B. 圖 12A 係於組織因子不存在的情況下，基於脂質濃度來顯示通過 FVIIa (NovoSeven)或 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)之經活化的因子 X 的生成速率比較。圖 12B 係於組織因子不存在的情況下，基於脂質濃度來顯示通過 FVIIa (NovoSeven)或 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)而生成之經活化的因子 X 的比較。

【049】 圖 13. 其係於組織因子不存在的情況下，基於因子 X 濃度來顯示 FVIIa (NovoSeven)與 MOD-5014 之間之經活化的因子 X 的生成比較。

【050】 圖 14. 其係基於聚凝胺來顯示通過 FVIIa (NovoSeven)與 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)之受質(Pefachrome FVIIa)裂解的抑制比較。

【051】 圖 15A-15C. 其係基於 TFPI 濃度（圖 15A）及針對 FVIIa（圖 15B）與 MOD-5014（圖 15C）之 TFPI 暴露期間，顯示通過 FVIIa (NovoSeven)與 CTP 修飾的 FVIIa (MOD-5014)之受質(Pefachrome FXa)裂解的抑制比較。

【052】 圖 16. 其顯示 CTP 修飾的 FVII-CTP₃之上游製造流程生產圖。

【053】 圖 17. 其呈現 CTP 修飾的 FVII-CTP₃之純化製程的流程圖。

【054】 圖 18. 其呈現經純化之 CTP 修飾的 FVII-CTP₃所降低的 SDS-PAGE 結果。

【055】 圖 19. 其顯示在全部的 N 型醣鏈中之帶電荷的 N 型醣鏈的百分比於純化製程期間是一致的，初始的帶電荷的 N 型醣鏈百分比係受到上游細胞培養製程的影響。

【056】 圖 20. 其呈現氧化形式與其它相關形式的含量在整個純化製程中是減少的。在減少氧化形式與相關形式方面複合模式及 HIC 管柱係為具有最顯著效果的純化步驟。

【057】 圖 21. 其呈現通過複合管柱移除非 γ 羧化蛋白的結果。CHT 管柱藉由移除非 γ 羧化蛋白而增濃了 γ 羧化的流份。

【058】 圖 22. 其呈現整個純化製程中的唾液酸含量。該唾液酸含量於純化製程期間是一致的，初始的唾液酸含量係受到上游細胞培養製程的影響。

【實施方式】

【059】 於一實施例中，本發明所揭露的是一種製造人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類因子 VII (FVII)多肽之方法，其中該 FVII 包括三個以串聯方式連接至其 C 端之 CTP 分子，該方法包括以下步驟：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及，純化該澄清採集溶液，以取得一個具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVII 之純化蛋白溶液；藉以製造 CTP 修飾的 FVII，其中所製造之 CTP 修飾的 FVII 的胺基酸序列係陳述於 SEQ ID NO: 7 中。

【060】 於一實施例中，本發明所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類因子 VII (FVII)，其包括三個以串聯方式連接至其 C 端之 CTP 分子，其中所述 CTP 修飾的因子 FVII 係藉由一種包括以下

步驟之方法所製造：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及純化該澄清採集溶液，以取得一個具有所期望濃度之 CTP 修飾的 FVII 之純化蛋白溶液，其中所製造之 CTP 修飾的 FVII 係包括陳述於 SEQ ID NO: 7 中的胺基酸序列。

【061】 於一實施例中，本發明所揭露的是一種包括有人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類因子 VII (FVII)之組合物，所述人類因子 VII 包括有三個以串聯方式連接至其 C 端之 CTP 分子。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係包括一經活化之 CTP 修飾的 FVII (CTP 修飾的 FVIIa)。

人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的因子 VII 多肽

【062】 凝血因子 VII (FVII)是做為無活性前酶由肝細胞分泌進血流中的 444 個胺基酸的醣蛋白 (50KDa)。在組織損害和暴露於循環血液以後，FVII 會與組織因子(TF)形成複合物，所述組織因子是 FVII 的真實受體蛋白且由位於血管壁的深層中的不同細胞表現。該 FVII-TF 複合物的形成會導致 FVII 的活化。活化的 FVII (FVIIa)會通過活化因子 IX 和因子 X 啟動外因性凝血路徑。FVII 屬於一群與凝血系統有關的維生素 K 依存性的醣蛋白。FVII 被合成為具有 N-端前肽和隨後的成熟胺基酸序列的前驅物。所述前肽含有 γ 羧化酶的對接位點，所述 γ 羧化酶將麩胺酸(Glu)轉化成 γ 羧基麩胺酸(Gla)。羧基麩胺酸(Gla)是一個罕見的胺基酸，其係藉由麩胺酸殘基的後轉譯羧化而被引入蛋白質。此修飾引入了對於鈣離子的親和性，其中需要維生素 K 來引入凝血因子（包含因子 FVII）的 γ -羧化。Gla 結構域與鈣離子的高親和性結合相關，且其在凝血方面扮演了重要角色。該結

構域後面是 2 個表皮生長因子樣(EGF)結構域、連接區域(CR)和 C-端絲胺酸蛋白酶結構域。在分泌之前，FVII 前肽係經裂解（其中該訊息肽係被移除），從而形成 406 個胺基酸的單鏈酶原 FVII 醣蛋白。在分泌之後，所述蛋白可以通過在 CR 中的裂解而活化成雙硫鍵連接的雙鏈異二聚體 FVIIa。FVII 的血漿濃度是 10 nM，且大約 1%在健康個體中以活性形式循環。

【063】 在一實施例中，本文提供了一種延長 FVII 或 FVIIa 的生物半衰期之方法或提高曲線下面積(AUC)之方法，所述方法包括下述步驟：將 3 個 CTP 連接至 FVII 或 FVIIa 的羧基端，藉以延長所述 FVII 或 FVIIa 的生物半衰期或提高 AUC。

【064】 在另一實施例中，本文中所揭露的是一種降低因子 VIIa (FVIIa) 多肽施用頻率的方法，所述方法包括下述步驟：將三個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)連接到所述 FVIIa 多肽的羧基端，藉以降低所述 FVIIa 多肽的施用頻率。

【065】 在另一實施例中，本文中所揭露的是一種降低因子 VIIa (FVIIa) 多肽清除率的方法，所述方法包括下述步驟：將三個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端，藉以降低 FVIIa 多肽的清除率。

【066】 於一實施例中，本文中所揭露的是一種產生經活化之 CTP 修飾的因子 VII (FVIIa)多肽之方法，其包括將三個絨毛膜促性腺激素羧基端肽連接到所述 FVIIa 多肽之羧基端的步驟，藉以產生 CTP 修飾的 FVIIa 多肽。

【067】 在另一個實施例中，本發明的凝血因子是蛋白。在另一個實施例中，本發明的凝血因子是肽。在另一個實施例中，本發明的凝血因子是多肽。在另一個實施例中，所述凝血因子是酶。在另一個實施例中，所述凝血因子是絲胺酸蛋白酶。在另一個實施例中，所述凝血因子是醣蛋白。

在另一個實施例中，所述凝血因子是維生素 K 依存性醣蛋白。在另一個實施例中，所述凝血因子是維生素 K 非依存性醣蛋白。在另一個實施例中，所述凝血因子是轉麩胺酸醯胺基酶。在另一個實施例中，所述凝血因子是無活性酶原。在另一個實施例中，所述凝血因子是本領域技術人員已知的任何凝血因子。在另一個實施例中，所述凝血因子是因子 VIIa (FVIIa)。

【068】 在另一個實施例中，所述凝血因子是重組蛋白。在另一個實施例中，所述凝血因子是重組醣蛋白。在另一個實施例中，所述凝血因子是重組 FVII。在另一個實施例中，所述凝血因子是重組 FVIIa。在另一個實施例中，所述凝血因子包括訊息肽。在另一個實施例中，重組凝血因子並不包括訊息肽。在另一個實施例中，經活化的凝血因子並不包括訊息肽。

【069】 在另一個實施例中，凝血因子係包括 3 個連接至 C-端的 CTP 重複且不包含連接至 N-端的 CTP。

【070】 在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa)多肽，其由 FVIIa 多肽和連接至所述 FVIIa 的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)所組成。

【071】 於另一實施例中，所述凝血因子為包括有與 FVII 的結構域結構類似或相同的結構域組構之凝血因子。於另一實施例中，所述凝血因子被合成為具有 N-端前肽（訊息序列）的前驅物。於另一實施例中，本文中所述的凝血因子係呈無活性的酶原形式。於另一實施例中，如本文中所述的凝血因子係為無活性的酶原，其係已被細胞分泌且缺少 N 端訊息序列。於另一實施例中，本文中所述的凝血因子係為經活化的凝血因子。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係呈無活性的酶原形式直至其被活化。於另一實施例中，如本文中所述之 CTP 修飾的 FVII 係為經活化的凝血因子。於另一實施例中，所述凝血因子是在肝細胞中產生。於另一實施例中，所述凝血因子包含 γ 羧化酶的對接位點，所述 γ 羧化酶將麩胺酸(Glu)轉化成 γ 羧基麩胺酸(Gla)。於另一實施例中，如本文中所述的凝血因子為市售

可得的凝血因子。

【072】 於一實施例中，本文中所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 高效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【073】 於一實施例中，本文中所揭露的是一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 至少 10 U/mg 的效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【074】 於一相關的實施例中，所述高唾液酸含量係由至少 15 mol/mol 所組成。在另一相關態樣中，該高度醣基化形式係包括至少 10 mol/mol 的 O 型醣鏈含量。在另一相關態樣中，實質純質及活性形式係包括至少 60% 之高度醣基化形式之活性 CTP 修飾的 FVIIa。在另一相關態樣中，至少 60%之所述實質純質與 CTP 修飾的 FVIIa 形式係包括高比例的羧化麩胺酸(Gla)殘基。在另一相關態樣中，所述高比例的羧化麩胺酸(Gla)殘基係由至少 90%的 Gla 殘基組成。在另一相關態樣中，所述低比例的氧化形式係由少於 5%所組成。在另一相關態樣中，所述實質純質與活性 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度為至少 90%。在一另外的相關態樣中，該純度百分比係選自由已下組成之群：97.3%、97.6%、97.4%及 97.0%。在另一相關態樣中，

所述實質純質與活性 CTP 修飾的 FVII 多肽之效價為 10,500 U/mg。在一另外的相關態樣中，該效價係選自由以下組成之群：15,563 U/mg、16,720 U/mg、22,478 U/mg 及 23,608 U/mg。

【075】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有所述 CTP 修飾的 FVIIa 以及一醫藥上可接受的載體之組合物，所述 CTP 修飾的 FVIIa 係包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 高效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【076】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有所述 CTP 修飾的 FVIIa 以及一醫藥上可接受的載體之組合物，所述 CTP 修飾的 FVIIa 係包括：(a) 高唾液酸含量；(b) 低度氧化形式；(c) 高度醣基化形式；(d) 高比例的羧化麩胺酸殘基；(e) 高比例之帶電荷的 N 型醣鏈；以及(f) 至少 10,500 U/mg 的效價；或其任何組合；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【077】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有所述 CTP 修飾的 FVIIa 之組合物，其中所述 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，所述 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：

- a. 高唾液酸含量；
- b. 高度醣基化形式；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 進一步包括以下至少一者：
- c. 低度氧化形式；
- d. 高比例的羧化麩胺酸殘基；
- e. 至少 60%帶電荷的 N 型醣鏈；或
- f. 至少 10,500 U/mg 的效價；

或其任何組合；且

其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列。

【078】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有所述 CTP 修飾的 FVIIa 之組合物，其中所述 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，所述 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：

- a. 高唾液酸含量；
- b. 高度糖基化形式；其中該 CTP 修飾的 FVIIa 進一步包括以下至少一者：
- c. 低度氧化形式；
- d. 高比例的羧化麩胺酸殘基；
- e. 至少 60%帶電荷的 N 型糖鏈；或
- f. 至少 10,500 U/mg 的效價；

或其任何組合；且

其中該 CTP 修飾的 FVIIa 係包括 SEQ ID NO: 7 中所陳述的胺基酸序列，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 的胺基酸序列在結構上係呈現為雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體，其包括介於 SEQ ID NO: 7 之半胱胺酸殘基 135 與半胱胺酸殘基 262 之間的雙硫(S-S)鍵，且其中所述雙鏈係包括一包括有 SEQ ID NO: 7 之第 1-152 個胺基酸的輕鏈以及一包括有 SEQ ID NO: 7 之第 153-490 個胺基酸的重鏈。

【079】 於一實施例中，編碼因子 FVII 的核酸序列係包括下列核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagtcttcgtaaccaggaggaagccacggcgctcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttctggaggagctgcg

gccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgtccttcgaggaggcccgaggagatcttcaagga
cgcgagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgtggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgg
gggtcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgttctgcctccctgccttcgaggggccggaactgtgagacg
cacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtactgcagtgaccacacgggca
ccaagcgtcctgtcgggtgccacgaggggtactctctgtctggcagacgggggtgtcctgcacaccacagttgaat
atccatgtggaaaaatactattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggggcaag
gtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgtgtgtgtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctg
atcaacaccatctgggtggtctccgcgggccactgtttcgacaaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtg
ctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcggtggcgaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgtccgcctgcaccagcccgtggtcctcactg
accatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgtggccttcgtgcgcttctcattggtc
agcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctga
tgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccaaatatcacggagtacatgttctgtgccg
gtactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtggaggcccatgccaccactaccggggca
cgtggtacctgacgggcacgtcagctggggccagggtgcgcaaccgtggggccactttggggtgtacaccag
ggtctcccagtagatcagtggtgcaaaagctcatgcgtcagagccacgcccaggagtctcctgcgagccc
catttcctgaggatgcggccgc (SEQ ID NO: 1)。

【080】 於另一實施例中，因子 FVII 的胺基酸序列係包括下列胺基酸
序 列：

MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRP
GSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTK
RSCRCHEGYSLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC
PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAV
LGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLR LHQPVVLT D
HVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRL
MTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFVGYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLL
RAPFP (SEQ ID NO: 2)。

【081】 於另一實施例中，因子 FVII 的胺基酸序列係包括下列胺基酸
序 列 :

MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRP
GSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTK
RSCRCHEGYSLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC
PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAV
LGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT
D HVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRL
MTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLL
RAPFPGCGR (SEQ ID NO: 3) 。

【082】 於另一實施例中，編碼因子 VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基端）
的 核 酸 序 列 係 包 括 下 列 核 酸 序 列 :

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcagtctt
cgtaaccaggaggaagccacggcgctcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttctggaggagctgcg
gccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgtccttcgaggaggcccgaggagatcttcaagga
cgcgagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgtggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgg
gggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacg
cacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtactgcagtgaccacacgggca
ccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgcacaccacagttgaat
atccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggggggcaag
gtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggtcctgtgttggtgaatggagctcagttgtgtggggggaccctg
atcaacaccatctgggtggtctccgcgggccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtg
ctgggcgagcagcacctcagcgagcacgacgggatgagcagagccggcggggtggcgcgaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactg
accatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtc
agcggtgggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctga
tgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaatatcacggagtacatgttctgtgccg

gctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtggaggcccatgccaccactaccggggca
cgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggtgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccag
ggtgtcccagtacatcagtggtgcagaaactgatgagaagcgagcccagaccggcgtgctgctgagagcc
ccctccccagcagcagctccaaggccccctccccctagcctgccagccctagcagactgcctgggcccagtga
caccctatcctgcctcagtcagtcagcaaggccccacccccctagcctgccttctccttctcggctgcctggcc
ccagegatactccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatccccagcagact
gccaggcccttctgatacccatcctccacagtgatgaggatccgcggccgcttaattaa (SEQ ID NO:
4)。

【083】 於另一實施例中，因子 VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基端）的
胺 基 酸 序 列 係 包 括 下 列 胺 基 酸 序 列：
MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRP
GSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTK
RSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC
PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAV
LGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT
D HVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNPRL
MTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLL
RAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 5). In another
embodiment, amino acids 1-38 of SEQ ID NO: 5 comprise a signal sequence. In
another embodiment, the amino acid sequence of the signal sequence comprises
MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRR (SEQ ID NO:
6)。

【084】 於另一實施例中，缺少訊息肽之因子 VII-CTP-CTP-CTP（連接
至羧基端）的胺基酸序列係包括下列胺基酸序列：ANAFLEELRP
GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF WISYSDGDQC
ASSPCQNGGS CKDQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI

CVNENGGCEQ YCSDHTGTKR SRCHEGYSL LADGVSCTPT
VEYPCGKIPI LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGECPWQVLL
LVNGAQLCGG TLINTIWVVS AAHCFDKIKN WRNLI AVLGE
HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVPGTTN HDIALLR LHQ
PVVLTDHVVP LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR
GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS PNITEYMFCA
GYSDGSKDSC KGDSGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT
VGHFVGVYTRV SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFPSSSS
KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQSSSSKA PPPSLPSPSR
LPGPSDTPIL PQSSSSKAPP PSLPSPSRLP GPSDTPILPQ (SEQ ID NO:
7)。

【085】 於另一實施例中，經活化的因子 VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基端）(FVIIa-CTP₃)之胺基酸序列係缺少訊息肽，且包括 SEQ ID NO: 7 中所提出的胺基酸序列。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 係缺少訊息肽，且包括 SEQ ID NO: 7 的同源物。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 係缺少訊息肽，且包括 SEQ ID NO: 7 的變異體。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 的胺基酸序列係於第 152 個殘基的精胺酸(R)與第 153 個殘基異白胺酸(I)之間裂解。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 的胺基酸序列在結構上係呈現為雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體，其包括存在於每個鏈上的半胱胺酸殘基之間之雙硫 S-S 鍵。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 的胺基酸序列在結構上係呈現為一包括有輕鏈與重鏈的異二聚體，所述輕鏈與重鏈係由一個存在於輕鏈中的半胱胺酸殘基與一個存在於重鏈中的半胱胺酸殘基之間雙硫-S-S-鍵所連結。於另一實施例中，該輕鏈係包括 FVIIa-CTP₃ 胺基酸序列的 N 端片段，而該重鏈係包括 FVIIa-CTP₃ 胺基酸序列的 C 端片段。於另一實施例中，該半胱胺酸殘基係可為任一鏈中的任何半胱胺酸殘基。於另一實施例中，FVIIa-CTP₃ 的胺基酸序列在結構上係呈現為雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體，其包括介於 SEQ ID NO: 7 之半胱胺酸殘基 135 與半胱胺酸殘基 262 之間的 S-S 鍵，且其中所述雙鏈係包括一包括有 SEQ ID NO: 7 之第 1-152 個胺基

酸的輕鏈以及一包括有 SEQ ID NO: 7 之第 153-490 個胺基酸的重鏈。

【086】 於另一實施例中，輕鏈在變性條件下的 SDS-PAGE 中係遷移到約 25 kDA。於另一實施例中，重鏈在變性條件下的 SDS-PAGE 中係遷移到約 50 kDA。於另一實施例中，重鏈在變性條件下的 SDS-PAGE 中係遷移到約 60 kDA。

【087】 於另一實施例中，通過連接三個 CTP 於其 C 端上來修飾之經活化的 FVII (FVIIa-CTP-CTP-CTP)之輕鏈係包括 SEQ ID NO: 8。

【088】 ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWIS
YSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICV
NENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPIIL
EKRNASKPQGR (SEQ ID NO: 8)。

【089】 於另一實施例中，通過連接三個 CTP 於其 C 端上來修飾之經活化的 FVII (FVIIa-CTP-CTP-CTP)之重鏈係包括 SEQ ID NO: 9。

【090】 IVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAA
HCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH
DIALRLHQPVVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR
GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFCAGYSDGSKD
SCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIE
WLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSS
SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 9)。

【091】 在另一個實施例中，將弗林加入到表現本發明之凝血因子-CTP 的細胞中。在另一個實施例中，弗林增加了細胞中本發明之凝血因子-CTP 的生產效率。在另一個實施例中，將弗林與包括有本發明之凝血因子-CTP 的編碼序列的載體共轉染。在另一個實施例中，弗林係由一單獨的載體編碼。在另一個實施例中，弗林和凝血因子-CTP 係由一個載體編碼。在另一個實施例中，將弗林的編碼序列插入 pCI-DHFR 中。在另一個實施例中，

弗林的編碼序列係經工程改造進 pCI-dhfr/smaI+NotI、弗林蛋白酶/AsiI F.I.+NotI 中。

【092】 於另一實施例中，編碼弗林之核酸序列係包括下列核酸序列：

tctagagtcgaccccgccatggagctgagggcctggttgctatgggtggtagcagcaacaggaaccttggtcctg
ctagcagctgatgctcagggccagaaggtcttcaccaacacgtgggctgtgcgcatccctggaggcccagcggt
ggccaacagtgtggcacggaagcatgggttcctcaacctggggccagatcttcggggactattaccacttctggcat
cgaggagtgcgaagcggtccctgtcgcctcaccgcccgcggcacagccggctgcagagggagcctcaagta
cagtggctggaacagcaggtggcaaagcgacggactaaacgggacgtgtaccaggagcccacagaccccaag
tttctcagcagtggtacctgtctggtgtcactcagcgggacctgaatgtgaaggcggcctgggcgagggctac
acagggcacggcattgtggtctccattctggacgatggcatcgagaagaaccacccggacttggcaggcaattat
gatcctggggccagttttgatgtcaatgaccaggacctgacccccagcctcggtacacacagatgaatgacaac
aggcacggcacacggtgtgcgggggaagtggctgcggtggccaacaacggtgtctgtggtgtaggtgtggcct
acaacgcccgcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgacagatgcagtggaggcacgctcgctgg
gcctgaacccaaccacatccacatctacagtgccagctggggccccgaggatgacggcaagacagtggatgg
gccagcccgctcgccgaggaggccttcttccgtgggggttagccagggccgaggggggctgggctccatctttg
tctgggcctcggggaacggggggccgggaacatgacagctgcaactgcgacggctacaccaacagtatctacac
gctgtccatcagcagcgccacgcagtttgcaacgtgccgtggtacagcgaggcctgctcgtccacactggcca
cgacctacagcagtggaaccagaatgagaagcagatcgtgacgactgacttgcggcagaagtgcacggagctt
cacacgggcacctcagcctctgcccccttagcagccggcatcattgctctcacctggaggccaataagaacctc
acatggcgggacatgcaacacctggtggtacagacctgaagccagcccacctcaatgccaacgactgggcca
ccaatggtgtgggcccggaaagtgagccactcatatggctacgggcttttgacgcaggcgccatggtggccctg
gcccagaattggaccacagtggccccccagcggaaagtgcacatcgacatcctcaccgagcccaaagacatcg
ggaaacggctcgaggtgcggaagaccgtgaccgctgcctgggcgagcccaaccacatcactcggttgagc
acgtcaggcgcggtcacctgtcctataatcgccgtggcgacctggccatccacctggtcagccccatgggca
cccgtccacctgctggcagccaggccacatgactactccgcagatgggtttaatgactgggccttcatgacaac
tcattctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcctagagattgaaaacaccagcgaagccaacaactatgg
gacgctgaccaagttcacctcgtactctatggcaccgcccctgaggggctgcccgtacctccagaaagcagtg
ctgcaagacctcacgtccagtcaggcctgtgtggtgtgcgaggaaggcttctccctgcaccagaagagctgtgt
ccagcactgcccctcaggcttcgcccccaagtctcgatacgactatagcaccgagaatgacgtggagaccat
ccggggccagcgtctgcgccccctgccacgcctcatgtgccacatgccagggggccggcctgacagactgcctc

agctgccccagccacgcctccttgaccctgtggagcagacttgctcccgcaaagccagagcagccgagagt
ccccgccacagcagcagccacctcggtgccccggaggtggaggcggggcaacggctgcgggcagggctg
ctgccctcacacctgcctgaggtggtggccggcctcagctgcgccctcatcgtgctggtcttcgtcactgtcttcctg
gtcctgcagctgcgctctggcttagtttcgggggggtgaaggtgtacaccatggaccgtggcctcatctcctacaa
ggggctgccccctgaagcctggcaggaggagtcccgtctgactcagaagaggacgagggccggggcgaga
ggaccgcctttatcaaagaccagagcgcctctgaacgcggccgc (SEQ ID NO: 10)。

【093】 於另一實施例中，弗林之胺基酸序列係包括下列胺基酸序列：
MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANS
VARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQW
LEQQVAKRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQG
YTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFVDVNDQDPDPQPRYTQM
NDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDV
EARS LGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRGVSQGRGG
LGSIFVWASGNNGREHDSCNCDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEAC
SSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLE
ANKNL TWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLL
DAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGE
P NHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADG
FNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAP
EGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGLHQLHQSVCVQHCPPGFAPQVLD
T HYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQT
CSRQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFI
VLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQEECP
SD SEEDEGRGERTAFIKDQSAL (SEQ ID NO: 11)。

【094】 在一個實施例中，術語凝血因子進一步包含已知的凝血因子同
系物。在一個實施例中，所述同系物具有凝血活性。在某些實施例中，根
據本發明的同源性也涵蓋缺失、插入或置換變異體，包含其胺基酸置換以
及其生物活性的多肽片段。在一個實施例中，所述變異體包括保守置換，
或沒有顯著改變凝血因子之三維結構的缺失、插入或置換。在另一個實施

例中，所述缺失、插入或置換沒有改變凝血因子的相關功能，在一個實施例中所述相關功能是結合一特定的結合配偶體。

【095】 在另一個實施例中，本發明包含凝血因子的同系物。在另一個實施例中，本發明包含一個具有凝血活性之凝血因子的同系物。在另一個實施例中，本發明包含一個具有功能性結合之凝血因子的同系物。在另一個實施例中，本發明包含一個具有凝血活性之如本文中所述之凝血因子的同系物。在另一個實施例中，本發明包含一個具有功能性結合之如本文中所述之凝血因子的同系物。在另一個實施例中，使用國家生物技術資訊中心(NCBI)的 BlastP 軟體及使用預設參數，來判定同系物例如多肽與凝血因子具有至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 87%、至少 89%、至少 91%、至少 93%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同源性。

【096】 在另一個實施例中，如本文中所述的[(CTP) $n>1$ -凝血因子]係包括全長凝血因子或其活性片段，其在它的羧基端通過肽鍵與至少一個 CTP 單元連接，在它的胺基端沒有 CTP。在另一個實施例中，如本文中所述的[(CTP) $n>1$ -凝血因子]係包括凝血因子或其活性片段，其通過肽鍵與至少一個 CTP 單元連接，在它的胺基端沒有 CTP，所述 CTP 單元通過肽鍵與另一個 CTP 單元連接。在另一個實施例中，一核酸分子係編碼經工程改造的凝血因子，所述經工程改造的凝血因子包括有連接至其 C-端的至少一個 CTP 且於其胺基端沒有 CTP。

【097】 在另一個實施例中，所述 CTP 通過一個連接子而連接至凝血因子。在另一個實施例中，將 CTP 序列與凝血因子連接的連接子為共價鍵。在另一個實施例中，將 CTP 序列與凝血因子連接的連接子為肽鍵。在另一個實施例中，將 CTP 序列與凝血因子連接的連接子是被取代的肽鍵。在另一個實施例中，所述 CTP 序列包括：DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 12)。在另一個

實施例中，所述 CTP 序列包括：SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13)。在另一個實施例中，所述 CTP 序列包括一選自陳述於 SEQ ID NO: 12 與 SEQ ID NO: 13 中之序列的胺基酸序列。

【098】 在另一個實施例中，本文中所揭露的羧基端肽(CTP)包含人絨毛膜促性腺激素的胺基酸 112 至 145 位置的胺基酸序列，如 SEQ ID NO: 12 所陳述。在另一個實施例中，本文中所揭露的 CTP 序列包含人絨毛膜促性腺激素的胺基酸 118 至 145 位的胺基酸序列，如 SEQ ID NO: 13 所陳述。在另一個實施例中，所述 CTP 序列也從在人絨毛膜促性腺激素的第 112-118 位置之間的任何位置開始並在第 145 個位置結束。在某些實施例中，所述 CTP 序列肽具有 28、29、30、31、32、33 或 34 個胺基酸的長度，並從 CTP 胺基酸序列的第 112、113、114、115、116、117 或 118 位開始。

【099】 在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 1-5 個保守胺基酸置換，如通過引用併入本文中之美國專利第 5,712,122 號所述。在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 1 個保守胺基酸置換。在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 2 個保守胺基酸置換。在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 3 個保守胺基酸置換。在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 4 個保守胺基酸置換。在另一個實施例中，所述 CTP 肽是絨毛膜促性腺激素 CTP 的變異體，其與天然 CTP 相差 5 個保守胺基酸置換。

【0100】 在另一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 肽胺基酸序列係與天然 CTP 胺基酸序列或其肽具有至少 70%同源性。在另一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 肽胺基酸序列係與天然 CTP 胺基酸序列或其肽具有至少 80%同源性。在另一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 肽胺基酸序

列係與天然 CTP 胺基酸序列或其肽具有至少 90%同源性。在另一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 肽胺基酸序列係與天然 CTP 胺基酸序列或其肽具有至少 95%同源性。在另一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 肽胺基酸序列係與天然 CTP 胺基酸序列或其肽具有至少 98%同源性。

【0101】 在另一個實施例中，編碼本文中所揭露之 CTP 肽的聚核苷酸係與天然人類 CTP DNA 序列或其肽具有至少 70%同源性。在另一個實施例中，編碼本文中所揭露之 CTP 肽的聚核苷酸係與天然人類 CTP DNA 序列或其肽具有至少 80%同源性。在另一個實施例中，編碼本文中所揭露之 CTP 肽的聚核苷酸係與天然 CTP DNA 序列或其肽具有至少 90%同源性。在另一個實施例中，編碼本文中所揭露之 CTP 肽的聚核苷酸與天然 CTP DNA 序列或其肽具有至少 95%同源性。在另一個實施例中，編碼本文中所揭露之 CTP 肽的聚核苷酸係與天然 CTP DNA 序列或其肽具有至少 98%同源性。

【0102】 在一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的至少一個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列二者被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 2 個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 3 個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 4 個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 5 個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 2 個或更多個被截短。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列全部被截短。在一個實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 14 的前 10 個胺基酸。在另一個實施例中，SEQ ID NO: 14 包括下述胺基酸(AA)序列：SSSSKAPPPSLP。在另一個實施例中，SEQ ID NO: 14 的前 10 個胺基酸係陳述於 SEQ ID NO: 15: SSSSKAPPPS 之中。

【0103】 在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 的前 10 個胺基酸。

【0104】 在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 的前 11 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 的前 12 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 的前 8 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 的前 13 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 的前 14 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 的前 6 個胺基酸。在一實施例中，所述截短的 CTP 包括 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 的前 5 個胺基酸。

【0105】 在一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的至少一個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 2 個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 3 個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 4 個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 5 個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的 2 個或更多個被醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列全部被醣基化。

【0106】 在一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 序列係包括至少一個醣基化位點。在一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 序列係包括 2 個醣基化位點。在一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 序列係包括 3 個醣基化位點。在一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 序列係包括 4 個醣基化位點。在一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的一個或更多個被完全醣基化。在另一個實施例中，所述絨毛膜促性腺激素 CTP 胺基酸序列中的一個或更多個被部分地醣基化。在一個實施例中，部分地醣基化係表示所述 CTP 醣基化位點中的一個被醣基化。在另一個實施例中，所述

CTP 糖基化位點中的 2 個被糖基化。在另一個實施例中，所述 CTP 糖基化位點中的 3 個被糖基化。

【0107】 在某些實施例中，所述 CTP 序列修飾在允許使用較低劑量方面是有利的。在某些實施例中，所述 CTP 序列修飾在允許較少給藥方面是有利的。在某些實施例中，所述 CTP 序列修飾在允許安全長效作用方面是有利的。

【0108】 在某些實施例中，本文中所使用的「多肽」、「經工程改造的凝血因子」或「蛋白」係涵蓋天然多肽（降解產物、合成的多肽或重組多肽）及肽擬似物（通常為經合成的合成多肽）、以及為多肽類似物的類肽和半類肽，其在某些實施例中具有使得包括有凝血因子的多肽在體內更穩定或更能夠透入細胞中之修飾。

【0109】 在某些實施例中，修飾係包含（但不限於）C-端修飾、多肽鏈修飾（包含（但不限於） $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH 或 CF=CH ）、主鏈修飾及殘基修飾。用於製備肽擬似物化合物之方法是本領域眾所周知的，例如在 *Quantitative Drug Design*, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) 中所具體描述，其係以引用方式併入且如同在本文中完整地闡述。在後文中提供了在這方面的其它細節。

【0110】 在某些實施例中，多肽內的多肽鍵(-CO-NH-)被取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被 N-甲基化鍵($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被酯鍵($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被酮亞甲基鍵($\text{-CO-CH}_2\text{-}$)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被 α -氮雜鍵(-NH-N(R)-CO-)取代，其中 R 是任何烷基，例如甲基、碳橋鍵($\text{-CH}_2\text{-NH-}$)。在某些實施例中，所述多肽鍵被羥基亞乙基鍵($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被硫代醯胺鍵(-CS-NH-)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被烯族雙鍵(-CH=CH-)取代。在某些實施例

中，所述多肽鍵被反醯胺鍵(-NH-CO-)取代。在某些實施例中，所述多肽鍵被多肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-)取代，其中 R 是天然存在於碳原子上的「正常」側鏈。在某些實施例中，這些修飾沿著多肽鍵發生在任何鍵，且在一個實施例中同時發生在幾個鍵(2-3 個鍵)。

【0111】 在某些實施例中，所述多肽的天然芳族胺氨基酸諸如 Trp、Tyr 和 Phe 被合成的非天然胺氨基酸置換，所述合成的非天然胺氨基酸是諸如苯基甘胺酸、TIC、萘基丙胺酸(Nol)、Phe 的環-甲基化衍生物、Phe 的鹵化衍生物或 o-甲基-Tyr。在某些實施例中，本文中所揭露的多肽係包含一個或多個修飾的胺氨基酸或者一個或多個非胺氨基酸單體(例如脂肪酸、複合碳水化合物等)。

【0112】 於一些實施例中，天然的胺氨基酸麩胺酸(Glu)係為經轉譯後羧化，導致羧基麩胺酸(Glu)存在於本文中所述之 CTP 修飾的 FVII 或 CTP 修飾的 FVIIa。

【0113】 在一個實施例中，「胺氨基酸」或「胺氨基酸序列」應被理解為包含：20 種天然存在的胺氨基酸；經常在體內轉譯後修飾的那些胺氨基酸，包含(例如)羧脯胺酸、磷酸絲胺酸和磷酸蘇胺酸；和其它罕見胺氨基酸，包含(但不限於)2-胺基己二酸、羧離胺酸、異鎖鏈素、正-纈胺酸、正-亮胺酸和鳥胺酸。在一個實施例中，「胺氨基酸」包含 D-及 L-胺氨基酸。

【0114】 在某些實施例中，將本文中所揭露之多肽用在要求包括凝血因子的多肽為可溶形式之治療中。在某些實施例中，本發明的多肽包括一個或更多個非天然的或天然的極性胺氨基酸（包含(但不限於)絲胺酸和蘇胺酸），其由於含羧基的側鏈而能增加多肽溶解度。

【0115】 在某些實施例中，以線性形式使用本文所揭露之經工程改造的凝血因子，但是本領域技術人員將理解，在環化不會嚴重干擾經工程改造的凝血因子特性的情況下，也可以使用環狀形式之經工程改造的凝血因子。

【0116】 在某些實施例中，本文所揭露之經工程改造的凝血因子是通過

生物化學方式合成的，諸如通過使用標準的固相技術合成。在某些實施例中，這些生物化學方法包含排它固相合成法、部分固相合成法、片段縮合法或經典的溶液合成法。

【0117】 在某些實施例中，將重組蛋白技術用於生成本文所揭露之經工程改造的凝血因子。在某些實施例中，將重組蛋白技術用於生成相對較長的多肽(例如長於 18-25 個胺基酸)。在某些實施例中，將重組蛋白技術用於生成大量之本文所揭露之經工程改造的凝血因子。在某些實施例中，重組技術由以下文獻描述：Bitter 等人, (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier 等人(1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson 等人(1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu 等人(1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi 等人(1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 及 Brogli 等人(1984) *Science* 224:838-843, Gurley 等人(1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 以及 Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, 第 VIII 部分, 第 421-463 頁，其全文係以引用方式併入本文中。

【0118】 在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸分子，其包含編碼如上文中所述之包括有凝血因子及連接至所述凝血因子的羧基端的促性腺激素羧基端肽之多肽的基因的編碼部分。在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸分子，其由編碼如上文中所述之包括有凝血因子及連接至所述凝血因子的羧基端的促性腺激素羧基端肽之多肽的基因的編碼部分組成。在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸分子，其基本上係由編碼如上文中所述之包括有凝血因子及連接至所述凝血因子的羧基端的促性腺激素羧基端肽之多肽的基因的編碼部分組成。

【0119】 在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸，其編碼如上文中所述之包括有凝血因子及連接至所述凝血因子的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽之多肽。在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸，

其編碼如上文中所述之由凝血因子及連接至所述凝血因子的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽組成之多肽。在另一個實施例中，本發明提供了一種聚核苷酸，其編碼如上文中所述之基本上由凝血因子和連接至所述凝血因子的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽組成之多肽。在一個實施例中，所述聚核苷酸是聚核苷酸序列。在一個實施例中，所述聚核苷酸是聚核苷酸分子。

【0120】 在另一個實施例中，本發明提供了一種表現載體，其包括如本文中所述的聚核苷酸分子。在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種表現載體，其包括編碼 CTP 修飾的多肽的聚核苷酸，所述 CTP 修飾的多肽係因子 VII 多肽和連接至所述 FVII 多肽的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)組成。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係從本文中所述的一個表現載體所表現，其可在表現後的某些時間點被活化，產生 CTP 修飾的 FVIIa。

【0121】 在另一個實施例中，本發明提供了一種細胞，其包括如本文中所述的表現載體。在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種包括有表現載體的細胞，所述表現載體包括編碼 CTP 修飾的多肽之聚核苷酸，所述 CTP 修飾的多肽係由因子 VII (FVII)多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端之 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)所組成。在另一個實施例中，從本文中所述的表現載體所表現且被包括在細胞內之 CTP-FVII 係可在從細胞分泌之後被活化。

【0122】 在另一個實施例中，本發明提供了一種包括有如本文中所述的表現載體之組合物。在另一個實施例中，本發明提供了一種包括有表現載體之組合物，所述表現載體包括有編碼 CTP 修飾的多肽之聚核苷酸，所述 CTP 修飾的多肽係由因子 VII (FVII)多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端的 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)所組成。

【0123】 在另一個實施例中，本發明提供了一種組合物，其包含如本文

中所述的細胞。在另一個實施例中，所述細胞是真核細胞。在另一個實施例中，所述細胞是原核細胞。

【0124】 在一實施例中，本發明提供了一種生產 CTP 修飾的 FVII 之方法，所述方法包括下述步驟：將 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)連接至所述 FVII 的羧基端，由此生產 CTP 修飾的 FVII。

【0125】 在另一個實施例中，使用編碼本文所揭露多肽之聚核苷酸分子來合成本文所揭露之經工程改造的凝血因子。在某些實施例中，將編碼該經工程改造的凝血因子的聚核苷酸分子連接進表現載體中，所述表現載體包含順式調節序列(例如，啟動子序列)的轉錄控制。在某些實施例中，所述順式調節序列係適於導引本文所揭露之經工程改造的凝血因子的組成型表現。在某些實施例中，所述順式調節序列係適於導引所述經工程改造的凝血因子的組織特異性表現。在某些實施例中，所述順式調節序列係適於導引所述經工程改造的凝血因子的可誘導表現。

【0126】 在某些實施例中，適合與本發明一起使用的組織特異性啟動子包括在一個或多個特定細胞群體中起作用的序列。實例包含(但不限於)：啟動子，諸如肝特異性的白蛋白的啟動子[Pinkert 等人, (1987) Genes Dev. 1:268-277]；淋巴樣特異性的啟動子[Calame 等人, (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]；尤其是 T-細胞受體[Winoto 等人, (1989) EMBO J. 8:729-733]和免疫球蛋白的啟動子；[Banerji 等人(1983) Cell 33:729-740]，神經元特異性的啟動子諸如神經絲啟動子[Byrne 等人(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477]；胰腺特異性的啟動子[Edlunch 等人(1985) Science 230:912-916]或乳腺特異性的啟動子，諸如乳清啟動子（美國專利第 4,873,316 號及歐洲申請公開第 264,166 號）。適合與本發明一起使用的誘導型啟動子包含(例如)四環素誘導型啟動子(Srour, M.A.等人, 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405)。

【0127】 在一個實施例中，短語“聚核苷酸分子”表示單鏈或雙鏈核酸序

列，其是分離的並且以 RNA 序列、互補聚核苷酸序列(cDNA)、基因組聚核苷酸序列和/或組合的聚核苷酸序列(例如上述形式的組合)的形式提供。

【0128】 在一個實施例中，“互補聚核苷酸序列”表示這樣的序列：其源自使用逆轉錄酶或任意其它 RNA 依存性的 DNA 聚合酶對資訊 RNA 的逆轉錄。在一個實施例中，隨後可以在體內或在體外使用 DNA 聚合酶擴增所述序列。

【0129】 在一個實施例中，“基因組聚核苷酸序列”表示這樣的序列：其衍生自染色體且因此它代表染色體的一個連續部分。

【0130】 在一個實施例中，“組合的聚核苷酸序列”表示這樣的序列：其為至少部分互補的和至少部分基因組的。在一個實施例中，組合的序列可以包括編碼本發明的多肽所需的一些外顯子序列，以及插入二者之間的一些內含子序列。在一個實施例中，所述內含子序列可以具有任何來源，包括其它基因，且通常包括保守剪接的訊息序列。在一個實施例中，內含子序列包括順式起作用的表現調節元件。

【0131】 在一個實施方案中，在表現和分泌之後，從前驅物經工程改造的凝血因子切除信號肽，從而產生缺乏信號肽之成熟的經工程改造的凝血因子之胺基酸序列。在另一實施例中，所述成熟的經工程改造的凝血因子係經活化。

【0132】 在某些實施例中，使用 PCR 技術或本領域技術人員已知的任何其它方法或規程來製備本發明的聚核苷酸。在某些實施例中，所述規程包括連接兩個不同的 DNA 序列（參見(例如) “Current Protocols in Molecular Biology”, Ausubel 等人編, John Wiley & Sons, 1992)）。

【0133】 在一個實施例中，將本文中所揭露之編碼經工程改造的凝血因子之聚核苷酸插入表現載體(即，核酸構建體)中，以實現重組多肽的表現。在一個實施例中，本文中所揭露之表現載體包含額外序列，所述額外序列使得該載體適合於在原核生物中複製和整合。在一個實施例中，本文中所

揭露之表現載體包含額外序列，所述額外序列使得該載體適合於在真核生物中複製和整合。在一個實施例中，本文中所揭露之表現載體包含穿梭載體，所述穿梭載體使得該載體適合於在原核生物和真核生物二者中複製和整合。在某些實施例中，選殖載體包含轉錄和轉譯起始序列(例如，啟動子、增強子)以及轉錄和轉譯終止子(例如，聚腺苷醯化信號)。

【0134】 在一個實施例中，多種原核或真核細胞可以用作宿主表現系統來表現本文中所揭露之凝血因子。在某些實施例中，這些包含(但不限於)：微生物，諸如用含有多肽編碼序列的重組噬菌體 DNA、黏質體、DNA 或黏質體 DNA 表現載體轉化的細菌；用含有多肽編碼序列的重組酵母表現載體轉化的酵母；用重組病毒表現載體(例如，花椰菜花葉病毒、CaMV；煙草花葉病毒、TMV)感染的或用含有多肽編碼序列的重組質粒表現載體(諸如 Ti 質粒)轉化的植物細胞系統。

【0135】 在某些實施例中，使用非細菌表現系統(例如哺乳動物表現系統，諸如 CHO 細胞)來表現本文所揭露之凝血因子。在一個實施例中，用於在哺乳動物細胞中表現本文所揭露聚核苷酸之表現載體係為包括有 CMV 啟動子和新黴素抗性基因的 pCI-DHFR 載體。根據一個實施例，pCI-dhfr 載體的構建根據一實施例係描述於國際專利申請第 PCT/IL2016/050645 號中，其全文係併入本文中。

【0136】 在某些實施例中，在本文所揭露之細菌系統中，根據表現的多肽的預期用途，可以有利地選擇許多表現載體。在一個實施例中，需要大量的多肽。在一個實施例中，需要指導蛋白產物的高水準表現的載體，可能是作為與疏水訊息序列的融合體，所述疏水訊息序列指導表現產物進入細菌周質或培養基中，在這些地方的蛋白產物易於被純化。在一個實施例中，用特異性裂解位點工程改造的某些融合蛋白以輔助多肽的回收。在一個實施例中，適合於這種操作的載體包含(但不限於)pET 系列的大腸桿菌表現載體[Studier 等人, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)]。

【0137】 在一個實施例中，使用酵母表現系統。在一個實施例中，許多含有組成型或誘導型啟動子的載體可以用於酵母中，如以全文引用方式併入本文中之美國專利第 5,932,447 號所公開的。在另一個實施例中，使用促進外源 DNA 序列整合進酵母染色體中的載體。

【0138】 在一個實施例中，本文所揭露之表現載體可以進一步包括額外聚核苷酸序列，其允許(例如)從單一 mRNA 轉譯幾種蛋白，諸如內核糖體進入位點(IRES)和用於啟動子嵌合多肽的基因組整合的序列。

【0139】 在某些實施例中，重組病毒載體可用於在體內表現本文所揭露之凝血因子，因為它們會提供諸如橫向感染和靶向特異性等優點。在一個實施例中，橫向感染是例如逆轉錄病毒的生命週期中固有的，是單個受感染細胞產生許多後代病毒顆粒及其出芽和感染相鄰細胞的過程。在一個實施例中，結果是，大面積被迅速感染，其中大部分最初未被原始病毒顆粒感染。在一個實施例中，產生不能橫向傳播的病毒載體。在一個實施例中，如果希望的目的是將指定基因僅導入局限數目的靶細胞中，該特性可以有用的。

【0140】 在一個實施例中，可以使用不同方法將本發明的表現載體導入細胞中。這樣的方法通常描述在：Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 等人, *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 等人, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa 等人[Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]，且包含(例如)穩定的或暫態的轉染、脂轉染、電穿孔和用重組病毒載體感染。另外，關於正-負選擇方法，參見美國專利第 5,464,764 及 5,487,992 號，其係以引用方式併入本文中。

【0141】 在某些實施例中，通過病毒感染導入核酸會提供勝過其它方法

(諸如脂轉染和電穿孔)的幾個優點，因為由於病毒的感染性質可以獲得更高的轉染效率。

【0142】 在一個實施例中，應當理解，也可以從核酸構建體表現本文揭露之經工程改造的凝血因子，使用在上文中描述的任何合適的施用模式將所述核酸構建體施用給個體(即，體內基因治療)。在一個實施例中，通過適當的基因遞送媒介物/方法(轉染、轉導、同源重組等)和必要的表現系統將所述核酸構建體導入合適的細胞中，然後將修飾的細胞培養擴增並返回所述個體(即，離體基因治療)。

【0143】 在一個實施例中，使用植物表現載體。在一個實施例中，多肽編碼序列的表現由許多啟動子驅動。在某些實施例中，使用病毒啟動子諸如 CaMV 的 35S RNA 和 19S RNA 啟動子[Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)]，或 TMV 的外殼蛋白啟動子[Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987)]。在另一個實施例中，使用植物啟動子，例如，RUBISCO 的小亞基[Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); and Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)]或熱激啟動子，例如，大豆 hsp17.5-E 或 hsp17.3-B [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]。在一個實施例中，使用 Ti 質粒、Ri 質粒、植物病毒載體、直接 DNA 轉化、顯微注射、電穿孔和熟習此項技術者眾所周知的其它技術，將構建體導入植物細胞中。參見(例如) Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, 第 421-463 頁(1988)]。本發明還可以使用本領域眾所周知的其它表現系統諸如昆蟲和哺乳動物宿主細胞系統。

【0144】 應當理解，除了含有插入的編碼序列(其編碼多肽)的轉錄和翻譯所必需的元件之外，本文所揭露之表現構建體還可以包括經工程改造以優化表現的多肽的穩定性、產生、純化、產量或活性的序列。

【0145】 在某些實施例中，將轉化的細胞在有效條件下培養，所述條件允許經工程改造的重組凝血因子以較高量表現。在某些實施例中，有效培

養條件包含(但不限於)允許蛋白產生的有效的培養基、生物反應器、溫度、pH 和氧條件。在一個實施例中，有效培養基表示在其中培養細胞以產生本發明的重組多肽的任何培養基。在某些實施例中，培養基通常包括水溶液，其具有可同化的碳、氮和磷酸鹽來源，和合適的鹽、礦物質、金屬和其它營養物諸如維生素。在某些實施例中，可以將本發明的細胞在常規發酵生物反應器、搖瓶、試管、微滴定平板和培養皿中培養。在某些實施例中，在適合重組細胞的溫度、pH 和氧含量條件下進行培養。在某些實施例中，培養條件的確定屬於本領域普通技術人員的專業技術。

【0146】 在某些實施例中，根據用於生產的載體和宿主系統，所得的本發明的經工程改造的凝血因子保留在重組細胞內、分泌進發酵培養基中、分泌進兩個細胞膜之間的空間(諸如大腸桿菌的周質間隙)；或保留在細胞或病毒膜的外表面上。

【0147】 在一個實施例中，在預定的培養時間之後，進行經工程改造的重組凝血因子的回收。

【0148】 在一個實施例中，本文中使用的短語“回收經工程改造的重組凝血因子”表示收集含有多肽的全部發酵培養基，且不一定暗示額外的分離或純化步驟。

【0149】 在一個實施例中，使用多種標準的蛋白純化技術來純化本發明的經工程改造的凝血因子，所述技術是例如，但不限於，親和性層析法、離子交換層析法、過濾、電泳、疏水相互作用層析法(HIC)、凝膠過濾層析法、逆相層析法、刀豆球蛋白 A 層析法、層析聚焦和差異溶解。

【0150】 於一實施例中，一種類型的疏水性相互作用管柱為 Capto Phenil Impress (CIP)管柱。

【0151】 在一個實施例中，為了促進回收，可以將表現的編碼序列工程改造成編碼本發明的經工程改造的凝血因子和融合的可裂解的部分。在一個實施例中，可以設計融合蛋白，使得所述多肽可以通過親和性層析法容

易地分離；例如，通過固定化在對可裂解的部分特異性的柱上。在一個實施例中，將裂解位元點工程改造在經工程改造的凝血因子和可裂解的部分之間，並且通過用在此位點特異性地裂解融合蛋白的合適酶或試劑處理，可以從層析管釋放多肽[例如，參見 Booth 等人, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 及 Gardella 等人, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)]。

【0152】 於一實施例中，本文中所揭露之經工程改造的凝血因子係以「實質純質」形式取回。於另一實施例中，實質純質之經工程改造的凝血因子可進一步包括活性形式的凝血因子。於另一實施例中，實質純質形式係為至少 90%是純的。於另一實施例中，實質純質形式係為至少 95%-99%是純的。

【0153】 在一個實施例中，使用體外表現系統，也可以合成本文揭露之的經工程改造的凝血因子。在一個實施例中，體外合成方法是本領域眾所周知的，所述系統的組分為市售可得的。

【0154】 在某些實施例中，合成和純化經工程改造的重組凝血因子；可以在體內或在體外測定其治療效果。在一個實施例中，使用本領域技術人員已知的各種測定法，可以確定本發明的經工程改造的重組凝血因子的結合活性。

【0155】 應瞭解，包括如本文中所述之要素或步驟的本文揭示之組合物及方法可在另一實施例中由彼等要素或步驟組成，或在另一實施例中，基本上由彼等要素或步驟組成。熟練的業內人士將瞭解，術語「包括」可涵蓋包括所指示的活性劑，諸如 CTP 修飾的凝血因子，以及包括其他活性劑及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑、潤滑劑、穩定劑等，如醫藥行業中所已知的。熟練的業內人士將瞭解，術語「基本上由.....組成」可涵蓋組合物，所述組合物之唯一的活性成分為所指示之活性成分，然而，可包含其他化合物，所述其他化合物用於穩定、保存等所述調配物，但並未直接參與所指示之活性成分的治療作用。熟練的業內人士將瞭解，術語「基本上

由.....組成」可涵蓋促進活性成分釋放之組分。熟練的業內人士將瞭解，術語「組成」可涵蓋組合物，其含有活性成分及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【0156】 在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種編碼 CTP 修飾的多肽之聚核苷酸，所述 CTP 修飾的多肽係由因子 VII (FVII)多肽和連接至所述 FVII 多肽的羧基端之 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)所組成。在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種包括表現載體的組合物，所述表現載體包括有編碼因子 VII (FVII)多肽之聚核苷酸和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端之 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)。在一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係包含訊息肽。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 並不包含訊息肽。

【0157】 在一個實施例中，本文中所揭露的是一種如上文所述的重組凝血因子。在一個實施例中，本文中所揭露的一種如上文所述的經工程改造的凝血因子。在一個實施例中，如上文所述的經工程改造的凝血因子被稱作 CTP 修飾的凝血因子。

【0158】 在一個實施例中，被連接至凝血因子的羧基端的 CTP 以串聯方式連接至羧基端。

【0159】 在一個實施例中，如本文中所述的經工程改造的凝血因子與未經 CTP 修飾的凝血因子相比具有相當的或改善的生物活性。在另一個實施例中，如本文中所述的經工程改造的凝血因子與未經 CTP 修飾的凝血因子相比具有相當的或改善的藥理學測量結果。在另一個實施例中，如本文中所述的經工程改造的凝血因子與未經 CTP 修飾的凝血因子相比具有相當的或改善的藥代動力學。在另一個實施例中，如本文中所述的經工程改造的凝血因子與未經 CTP 修飾的凝血因子相比具有相當的或改善的藥效動力學。

【0160】 在另一個實施例中，術語“CTP 肽”、“羧基端肽”和“CTP 序列”在本文中可互換地使用。在另一個實施例中，所述羧基端肽是全長 CTP。

【0161】 在其它實施例中，術語經工程改造的凝血因子表示成熟凝血因子的胺基酸序列。在其它實施例中，術語經工程改造的凝血因子表示包括它的訊息序列或訊息肽的凝血因子的胺基酸序列。

【0162】 在另一個實施例中，“訊息序列”和“訊息肽”在本文中可互換地使用，且皆有相同的品質與意義。在另一個實施例中，當提及聚核苷酸分子時，“序列”可以表示編碼部分。在另一個實施例中，與不具有至少一個 CTP 的相同凝血因子相比，如本文中所述之包括有至少一個 CTP 之經工程改造的凝血因子係具有增強的體內生物活性。在一個實施例中，所述增強的生物活性源自經工程改造的凝血因子的更長半衰期，同時維持至少一些生物活性。在另一個實施例中，所述增強的生物活性源自 CTP 修飾引起的增強的生物活性。在另一個實施例中，所述增強的生物活性源自 CTP 修飾的凝血因子的更長的半衰期和增強的功能性。

【0163】 在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會提供增強的對抗凝血因子降解的保護。在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會提供增強的對抗清除的保護。在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會提供延長的清除時間。在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會增強它的 C_{max} 。在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會增強它的 T_{max} 。在某些實施例中，在凝血因子的羧基末端端部處的至少一個 CTP 序列會延長它的 $T_{1/2}$ 。

【0164】 在另一個實施例中，以與未修飾的綴合的凝血因子相同的方式使用本發明的綴合的凝血因子。在另一個實施例中，本發明的綴合的凝血因子具有增加的循環半衰期和血漿停留時間、降低的清除率和增加的體內臨床活性。在另一個實施例中，由於如本文中所述的綴合的凝血因子的改善的性能，與未修飾形式的相同凝血因子相比以更低的頻率施用此綴合物。

【0165】 在另一個實施例中，降低的施用頻率會導致改善的治療策略，

這在一個實施例中會導致改善的患者順應性，從而導致改善的治療結果以及提高的患者生活品質。在另一個實施例中，與常規凝血因子綴合物相比，已經發現，具有本發明綴合物的分子量和接頭結構的綴合物具有改善的效價、改善的穩定性、提高的 AUC 數量和增強的循環半衰期。

組合物及使用方法

【0166】 在某些實施例中，合成和純化經工程改造的重組凝血因子；可以在體內或在體外測定其治療效果。在一個實施例中，使用本領域技術人員已知的各種測定法，可以確定本發明的經工程改造的重組凝血因子的結合活性。

【0167】 於一實施例中，「醫藥組合物」或「醫藥調配物」係指一或多種本文中所述之活性成分與其它化學成分（諸如生理學上適宜的載體與賦形劑）的製品。「醫藥組合物」或「醫藥調配物」的目的係便於將化合物施予生物體。在某些實施例中，「醫藥組合物」或「醫藥調配物」係提供藥學劑量形式的藥物。「醫藥組合物」或「醫藥調配物」在某些實施例中係包含緩慢釋放技術、透皮貼片或本領域中任何已知的劑量形式。

【0168】 在另一個實施例中，“活性成分”表示引起生物學效應的目標多肽序列。

【0169】 在另一實施例中，本文揭示之組合物中之任一種將包括以任何形式只結合於相關經工程改造的凝血因子羧基端之至少一個 CTP 序列。在一個實施例中，本文揭示組合的製劑。在一個實施例中，「組合的製劑」尤其定義「多部分套組」，意義在於如上文所定義的組合搭配物可獨立地給藥或藉由以有區別的量之組合搭配物使用不同的固定組合，亦即，同步、同時、分開或依序。在一些實施例中，多部分套組之各部分可接著例如同步投予或按時間順序錯開，亦即對於多部分套組之任一部分在不同時間點並且時間間隔相等或不同。在一些實施例中，組合搭配物之總量的比率可

以在組合製劑中投予。在一個實施例中，組合的製劑可改變，例如以便應對治療之患者亞群的需求或單個患者之需求，所述不同需求可歸因於具體疾病、疾病之嚴重度、年齡、性別或體重，如可由熟習此項技術者易於作出。

【0170】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa)多肽之醫藥組合物或醫藥調配物，所述 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa)多肽係由 FVIIa 多肽及連接至所述 FVIIa 的羧基端之 3 個促性腺激素羧基端肽(CTP)所組成。

【0171】 在另一個實施例中，本文提供了一種組合物，其包含如本文中所述的綴合的凝血因子。在另一個實施例中，本文提供了一種醫藥組合物，其包含如本文中所述的綴合的凝血因子。在另一個實施例中，本文提供了一種醫藥組合物，其包含治療有效量的如本文中所述的綴合的凝血因子。在一個實施例中，根據諸如要治療的具體病症、要治療的患者的狀況、以及組合物中的其它成分等因素，確定綴合的凝血因子的治療有效量。

【0172】 於一實施例中，本發明提供一種供使用在本發明之組合物、調配物及方法中的醫藥調配物。於另一實施例中，本發明提供一種包括有一由一個凝血因子與三個連接至該凝血因子的羧基端之絨毛膜促性腺激素羧基端肽所組成之多肽的醫藥調配物。於另一實施例中，該醫藥調配物進一步包括緩衝液及張力劑。於另一實施例中，所述緩衝液為 20 mM 檸檬酸及 13.3 mM 甘胺酸，而所述張力劑為 150 mM NaCl。於另一實施例中，所述調配物係約為 pH 6.4。於另一實施例中，所述緩衝液為 20 mM 檸檬酸及 13.3 mM 甘胺酸，而所述張力劑為 150 mM NaCl，且 pH 為 6.4。於另一實施例中，所述緩衝液為 20 mM 檸檬酸、100 mM 精胺酸、2%海藻糖且 pH 為 6.2。於另一實施例中，所述調配物為液體調配物。於另一實施例中，所述調配物為凍乾調配物。於另一實施例中，所述液體調配物係可使用凍乾之 CTP 修飾的凝血因子而形成。於另一實施例中，所述 CTP 修飾

的凝血因子為 FVII-CTP₃。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子為 FVIIa-CTP₃。

【0173】 於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每週一次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每天一次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每隔一天劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每三天一次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每週兩次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每週兩次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的每週一次劑型。於另一實施例中，本文中所提供的是一種包括有本文中所提供之醫藥調配物的雙週（每兩週）一次劑型。

【0174】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種包括有一由一個凝血因子與三個連接至該凝血因子的羧基端之絨毛膜促性腺激素 CTP 所組成之多肽的調配物，且其中所述多肽係可選擇性地由一訊息序列所組成，其中所述調配物具有提高的穩定性。於一實施例中，該調配物至少穩定一年。在另一實施例中，該調配物至少穩定兩年。

【0175】 於一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係調配成液體調配物。於另一實施例中，由 CTP 修飾的因子 VII 係調配成液體調配物。於另一實施例中，由 CTP 修飾的因子 VIIa 係調配成液體調配物。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係調配成鼻內劑型。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係調配成注射劑型。

【0176】 於另一實施例中，本發明之方法係包含在使用凝血因子療法時增加順應性，包括向有需要之個體提供一種 CTP 修飾的凝血因子，從而在使用凝血因子療法時增加順應性。

【0177】 於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每天施予個體一次。於另一實施例中，將包括有 CTP 修飾的凝血因子之多肽每兩天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每三天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每四天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每五天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每六天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每週施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每 7-14 天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每 10-20 天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每 5-15 天施予個體一次。於另一實施例中，將 CTP 修飾的凝血因子每 15-30 天施予個體一次。

【0178】 於一實施例中，本文中所揭露的製品係調配成用於經由注射器或筆形裝置進行注射之液體調配物。

【0179】 於一實施例中，本文中所提供的調配物亦包括防腐劑，諸如苯紮氯銨及硫柳汞及其類似物；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸鈉及其他；緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及乙酸鹽；張力劑，諸如氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露糖醇及其他；抗氧化劑，諸如抗壞血酸、乙醯胱胺酸、焦亞硫酸鈉及其他；芳族試劑；黏度調節劑，諸如聚合物，包含纖維素及其衍生物；以及聚乙醇醇，以及酸及鹼，用以按需要調節此等水性組合物之 pH。所述組合物亦包括局部麻醉劑或其他活性劑。組合物可以按噴霧劑、霧劑、滴劑及其類似形式使用。

【0180】 於一實施例中，本文中所描述的凝血因子係為人類凝血因子。

【0181】 於另一實施例中，如本文所述之綴合的凝血因子可用於治療罹患凝結或凝血病症的個體。於另一實施例中，如本文所述之綴合的凝血因子可用於血友病的預防性治療中因而降低出血與相關併發症的風險。於另一實施例中，降低出血與相關併發症的風險會降低自發性出血的風險。

於另一實施例中，降低出血與相關併發症的風險會降低出血過多的風險。
於另一實施例中，如本文中所述之綴合的凝血因子可用於治療罹患血友病的個體，同時降低發展針對外源地施用之凝血因子的抑制性抗體的風險。
於另一實施例中，如本文中所述之綴合的凝血因子可用於治療罹患血友病的個體，從而誘導體內穩態。

【0182】 在一個實施例中，本發明的 CTP 修飾的凝血因子具有治療用途。在另一個實施例中，本發明的 CTP 修飾的凝血因子具有預防用途。

【0183】 在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療經歷了過度出血或擦傷或具有延長的凝血酶原時間(PT)或部分促凝血酶原時間(PTT)的個體。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療具有導致出血的後天性病症(諸如維生素 K 缺乏或肝病)的個體。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療具有凝血因子缺乏的個體，所述凝血因子缺乏是後天性的(由於其它疾病)或遺傳性的、輕度或嚴重的、長期或暫時的。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療罹患 A 型血友病的個體。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療罹患 B 型血友病的個體。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療具有後天性缺陷的個體，所述後天性缺陷是由於慢性疾病諸如肝病或癌症；由於急性病症諸如彌漫性血管內凝血(DIC)，其在快速速率耗盡凝血因子；或者由於維生素 K 缺乏或使用維生素 K 拮抗劑如華法林(因子 II、VII、IX 和 X 的產生需要維生素 K)進行治療。在另一個實施例中，如本文中所述的綴合的凝血因子可用於治療罹患導致凝血失衡的疾病的個體，例如但不限於肝病、尿毒癥、癌症、骨髓障礙、暴露於蛇毒液、維生素 K 缺乏、抗凝血治療、抗凝血劑華法林的意外攝取、多次輸血(儲存的血單位喪失其凝血因子中的一些)或其組合。在另一個實施例中，本文所揭露的是一種治療個體的深靜脈血栓形成的方法，所述方法包括：施用本文所揭露之 CTP 修飾

的凝血因子。在另一個實施例中，本文所揭露的是一種預防具有血友病的個體的失控出血的方法，所述方法包括：施用本發明的 CTP 修飾的凝血因子。在另一個實施例中，本發明提供了一種預防具有血友病的個體的出血發作的方法，所述方法包括：施用本發明的 CTP 修飾的凝血因子。在另一個實施例中，本發明提供了一種控制具有 B 型血友病（先天性因子 IX 缺乏）的個體的出血發作的方法。

【0184】 於一實施例中，本發明之組合物係包括如本文中所述的調配物。於另一實施例中，本發明之方法係包括施予如本文中所述的調配物。於另一實施例中，本發明之方法係包括施予一包括有如本文中所述之調配物的組合物。

【0185】 在一個實施例中，本發明提供了一種預防或治療凝結或凝血病症的方法。在另一個實施例中，本發明提供了一種預防或治療個體的血友病的方法，所述方法包括：施用本發明的 CTP 修飾的凝血因子。在另一個實施例中，本發明提供了一種預防和治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：施用本發明的 CTP 修飾的凝血因子。在另一個實施例中，本發明提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：施用本發明的 CTP 修飾的因子 VIIa。

【0186】 於一實施例中，血友病為 A 型血友病。於另一實施例中，血友病為 B 型血友病。於另一實施例中，本發明之用於預防或治療凝結或凝血病症的方法係預防或治療患有 A 或 B 型血友病（分別帶有 FVIII 或 FIX 的抑制因子）之病患中的血友病。於另一實施例中，本發明之方法係用於預防或治療具有後天性血友病的患者（不具有抑制因子的血友病）。於另一實施例中，本發明之用於預防或治療凝固或凝結病症的方法係預防或治療不具有抑制因子的 A 或 B 型血友病。於另一實施例中，血友病為重度血友病。於另一實施例中，血友病為中度血友病。於另一實施例中，血友病為具有或不具有抑制因子之中度至重度血友病。本領域中熟習此項技術者應

瞭解，術語「中度至重度血友病」係指一個具有少於或等於 3% 的 FVIII 或 FIX 的個體。於另一實施例中，重度血友病可涵蓋等於約 0-1% 之凝血因子程度。於另一實施例中，所述血友病為中度血友病，其在另一實施例中係描述凝血因子程度為 1-5% 之血友病。於另一實施例中，所述血友病為輕度血友病，其在另一實施例中係描述凝血因子程度為 5-50% 之血友病。

【0187】 在另一個實施例中，本文所揭露的是一種預防或治療個體中的凝結或凝血病症的方法，所述方法包括：給所述個體施用 CTP 修飾的因子 VII (FVII) 多肽，所述 CTP 修飾的因子 VII (FVII) 多肽包括有 FVIIa 多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端之 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，藉以預防或治療所述個體中的凝結或凝血病症。

【0188】 在另一個實施例中，本發明提供了一種預防或治療個體的血友病的方法，所述方法包括：給所述個體施用 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa) 多肽，所述 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa) 多肽包括有 FVIIa 多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，藉以預防或治療所述個體中的血友病。

【0189】 在另一個實施例中，本文所揭露的是一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給所述個體施用一種或多種如本文中所述的 CTP 修飾的凝血因子。因而，在一個實施例中，本發明提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給所述個體施用 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa) 多肽，所述 CTP 修飾的因子 VIIa (FVIIa) 多肽包含 FVIIa 多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，由此治療所述個體中的血友病。在一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVIIa 在相同組合物中同時施用。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVIIa 在分開的組合物中同時施用。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的 FVIIa 在分開的組合物中在分開的時間施用。

【0190】 在另一個實施例中，本發明提供了一種預防或治療個體的血友

病的方法，所述方法包括：給所述個體施用 FVIIa 多肽和連接至所述 FVIIa 多肽的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，由此預防或治療所述個體中的血友病。

【0191】 在另一個實施例中，本文中所揭露的是一種預防或治療個體的血友病的方法，所述方法包括：給所述個體皮下或靜脈內地施用 CTP 修飾的因子 VIIa 多肽，其包括 VIIa 多肽和連接至所述 VIIa 多肽的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，藉以預防或治療所述個體中的血友病。在某些實施例中，本文提供了一種預防或治療個體中的血友病的方法，所述方法包括下述步驟：給所述個體施用 CTP 修飾的凝血因子，所述 CTP 修飾的凝血因子包括有連接至所述凝血因子的羧基端之 3-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)多肽，其中所述 CTP 修飾的凝血因子的序列係選自由 SEQ ID NO: 5 或 7 所組成之群，由此預防所述個體中的血友病。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子係選自由 SEQ ID NO: 5 或 7 所組成之群。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子係由 SEQ ID NO: 7 所組成。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子係由包括有活化 FVII (FVIIa)之 SEQ ID NO: 7 所組成。

【0192】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種治療個體之血友病的方法，其包括對該個體施予經活化之 CTP 修飾的因子 VII (FVIIa)多肽，所述 CTP 修飾的因子 VII (FVIIa)多肽係包括有一 FVIIa 多肽及三個連接到該 FVIIa 多肽的羧基端之絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)，藉以治療該個體的血友病。

【0193】 在另一個實施例中，與重組 FVII 相比，皮下施用會導致 CTP 修飾的 FVII 的更高生物利用度。在另一個實施例中，與 NovoSeven®的皮下施用相比，在 FVIIa-CTP₃皮下施用以後具有更長的半衰期和更高的生物利用度(AUC SC/AUC IV)。在另一個實施例中，與重組 FVII (NovoSeven®)相比，皮下注射的 MOD-5014 顯示出小鼠的存活提高。

【0194】 於一實施例中，MOD-5014 為 FVIIa-CTP₃（其具有三個連接於 C 端處之 CTP 肽）。於一實施例中，MOD-5014 係提供一長效型凝血因子。於一實施例中，MOD-5014 係提供一與重組人 FVIIa 相比更為持久及延長之血液凝固反應。本領域中熟習此項技術者應瞭解，術語 MOD-5014 或 FVIIa-CTP₃ 係可交換使用且具有完全相同的品質與意義，且在一實施例中係指一個包括有胺基酸序列 SEQ ID NO: 7 之雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體。再者，熟習此項技術者應瞭解，在描述本文中之凝血因子或 CTP 修飾的凝血因子（例如 FVII-CTP₃）時，FVII-CTP₃ 在某些例子中係可指非活化形式的 FVII-CTP₃。熟習此項技術者肯定會根據相關的細節（諸如活性）來識別所指的是哪種形式。同樣地，儘管術語 MOD-5014 係可與術語 FVIIa-CTP₃（即呈現活性形式之 CTP 修飾的凝血因子）交換使用，在某些例子中術語 MOD-5014 可用於表示活性形式的 FVII 或編碼 FVII-CTP₃ 的核苷酸序列，其接著將被細胞所表現及分泌，並在體外純化與活化，產生呈現為 MOD-5014 分子之活性形式的 FVIIa。

【0195】 於一實施例中，經由組織因子路徑抑制因子(TFPI)的 MOD-5014 去活化係具有劑量依存性。於一實施例中，經由 TFPI 的 MOD-5014 去活化顯示出與經由 TFPI 的重組 FVIIa (NovoSeven®)類似之劑量依存性失活模式。於一實施例中，MOD-5014 係受到抗凝血酶 III 的抑制。於一實施例中，在肝素存在或不存在的情況下，經由抗凝血酶 III 的 MOD-5014 抑制係顯示出與重組 FVIIa (NovoSeven®)相類似的抑制模式。

【0196】 於一實施例中，MOD-5014 係以劑量依存性方式生成凝血酶。於一實施例中，MOD-5014 減少了凝血酶產生的滯後期。於一實施例中，MOD-5014 減少了血液凝固的時間。於一實施例中，MOD-5014 增加了凝血塊形成的效率。於一實施例中，施予 MOD-5014 會減少個體中血液凝固的時間。於一實施例中，施予 MOD-5014 會增加個體中凝血塊形成的效率。於一實施例中，經由 MOD-5014 的凝血酶生成係與經由重組 FVIIa

(NovoSeven®)所產生的相似。於一實施例中，經由 MOD-5014 所減少的血液凝固時間係與經由重組 FVIIa (NovoSeven®)所產生的相似。於一實施例中，經由 MOD-5014 所增加的血液凝固效率係與經由重組 FVIIa (NovoSeven®)所產生的相似。

【0197】 如本文中所提供，CTP 連接到血液凝血因子（例如因子 FVII）會增加血液凝固因子的半衰期。實例顯示出 CTP 的连接（例如三個 CTP 連接到 FVIIA）並不會影響凝血活性。於一實施例中，CTP 連接到 FVII 並不會干擾血塊形成。於一實施例中，CTP 連接到 FVII 並不會影響干擾到所增加的凝血塊形成效率。於一實施例中，CTP 連接到 FVII 並不會影響干擾到所減少的凝血時間。於一實施例中，磷脂與 FVII 的結合係於 CTP 連接到血液凝固因子之後被維持住。

【0198】 於另一實施例中，本文中所揭露的是一種治療一個體的血友病之方法，該方法包括將本文所述之 CTP 修飾的凝血因子施予該個體。

【0199】 於其他實施例中，經工程改造的凝血因子係用於治療 B 型血友病患者。施予 MOD-5014 至大型哺乳動物（狗）的結果中，MOD-5014 的施用提供了一個針對血液凝固之有效且安全的長效型 FVIIa（參見國際專利申請第 PCT/IL2016/050645 號，其全文係併入本文中）。使用 MOD-5014 的治療係可為預防性的或按需的。於一實施例中，本文中所揭露的一種治療一個體的血友病之方法，該方法包括將 MOD-5014 施予該個體，藉以治療該個體的血友病。於一實施例中，本文中所揭露的一種預防一個體失血過多的方法，該方法包括將 MOD-5014 施予該個體，藉以防止該個體失血過多。於一實施例中，本文中所揭露的一種預防性治療一個體的血友病之方法，該方法包括將 MOD-5014 施予該個體，藉以預防性治療該個體的血友病。

【0200】 於一實施例中，以 MOD-5014 治療一個體的血友病係包括與重組 FVIIa (NovoSeven®)相比時之 MOD-5014 的施用頻率降低。於一實施例

中，以 MOD-5014 預防性治療一個體的血友病係包括與重組 FVIIa (NovoSeven®)相比時之 MOD-5014 的施用頻率降低。於一實施例中，以 MOD-5014 預防一個體失血過多係包括與重組 FVIIa (NovoSeven®)相比時之 MOD-5014 的施用頻率降低。

【0201】 於一實施例中，包括有 3 個以串聯方式連接至其羧基端的 CTP 之凝血因子 VII 係展現出增進的 PK 特徵曲線，同時維持其相對於 NovoSeven®之凝血活性。

【0202】 於另一實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物及方法係用於：治療具有 FVIII 或 FIX 的抑制因子之 A 或 B 型血友病患者以及具有後天性血友病的患者的出血發作；預防具有 FVIII 或 FIX 的抑制因子之 A 或 B 型血友病患者以及具有後天性血友病的患者在外科手術或侵入性手術中的出血；治療具有先天性 FVII 缺乏的患者的出血發作以及預防具有先天性 FVII 缺乏的患者在外科手術或侵入性手術中的出血。後天性血友病是一種自發性自體免疫疾病，其中先前正常止血的患者對凝血因子產生自體抗體，最常見的是 FVIII。抗 FVIII 的自體抗體的產生會導致 FVIII 缺乏，其導致藉由因子 IXa 與因子 VIIIa 複合物通過凝血級聯的內在途徑所生成的凝血酶不足。下列情況係可與後天性 A 型血友病產生關聯：自發性的、懷孕、自體免疫性疾病、發炎性腸道疾病、潰瘍性結腸炎、皮膚疾病（例如銀屑病、天皰瘡）、呼吸疾病（例如哮喘、慢性阻塞性肺疾病）、過敏性藥物反應、糖尿病、急性 B 型肝炎感染、急性 C 型肝炎感染、惡性實體腫瘤（例如前列腺、肺、結腸、胰腺、胃、膽管、頭頸部、子宮頸、乳腺、黑色素瘤、腎）、惡性血液疾病。本領域中熟習此項技術者應瞭解，自體免疫性疾病可包含風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡、多發性硬化症、顛動脈炎、薛格倫氏(sjögren)症候群、自體免疫性溶血性貧血、古巴士德氏(goodpasture)症候群、重症肌無力、葛瑞夫茲氏症(graves' disease)、自體免疫性甲狀腺功能低下症。本領域中熟習此項技術者應瞭解，過敏反應可能

發生在被施予盤尼西林及其衍生物、磺醯胺、苯妥英、氯黴素、甲基多巴、長效噻噸、干擾素 α 、氟達拉濱、卡介苗疫苗、去甲文拉法辛(desvenlafaxine)的個體身上。本領域中熟習此項技術者應瞭解，惡性血液疾病可包含慢性淋巴球性白血病、非何金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(waldenstrom macroglobulinemia)、骨髓造血分化不良症候群、骨髓纖維變性及紅血球性白血病。因此，在一實施例中，本文中所提供的是一種治療一個體的後天性白血病之方法，其包括對該個體施予本文中所提供之任何組合物。

【0203】 在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法是用於治療或預防肌肉出血。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法是用於治療或預防關節出血。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供鼻出血和牙齦出血、黏膜出血、向中樞神經系統中出血的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供胃腸或腦出血的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供低頻率輕度出血的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供低頻率中度出血的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供高頻率輕度出血的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供高頻率中度出血的治療或預防性處理。

【0204】 在一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供無症狀血友病的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供輕度至中度血友病的治療或預防性處理。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供重度血友病的治療或預防性處理。

【0205】 在一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提

供出血的治療或預防性處理，所述出血在一個實施例中是不可控制的出血，且在另一個實施例中是腦內出血。在另一個實施例中，本文中所揭露之組合物、調配物和方法會提供以下病症的治療或預防性處理：新生兒凝血病；嚴重肝病；高危外科手術；創傷性失血；骨髓移植；血小板減少症和血小板功能障礙；口服抗凝血劑的急迫反轉；因子 V、VII、X 和 XI 的先天性缺乏；或血管性血友病，在一個實施例中，具有馮威裡氏因子之抑制因子的馮威裡氏病(von Willebrand disease)的血管性血友病。

【0206】 在一個實施例中，本文中所揭露之 CTP 修飾的凝血因子是用於治療個體中的血友病或如本文中所述的有關疾病。在一個實施例中，所述個體是人。在一個實施例中，所述個體是人類兒童。在另一個實施例中，所述個體是馴化的動物。在另一個實施例中，所述個體是哺乳動物。在另一個實施例中，所述個體是家畜。在另一個實施例中，所述個體是猴。在另一個實施例中，所述個體是馬。在另一個實施例中，所述個體是母牛。在另一個實施例中，所述個體是小鼠。在另一個實施例中，所述個體是大鼠。在另一個實施例中，所述個體是犬科動物。在另一個實施例中，所述個體是貓科動物。在另一個實施例中，所述個體是牛、羊、豬、馬、鼠或鹿。在一個實施例中，所述個體是雄性。在另一個實施例中，所述個體是雌性。在一個實施例中，所述個體是兒童，在另一個實施例中，青少年，在另一個實施例中，成年人，或在另一個實施例中，老年個體。在另一個實施例中，所述個體是兒科個體，在另一個實施例中，老年病個體。

【0207】 在另一個實施例中，短語“生理上可接受的載體”和“藥學上可接受的載體”可互換地用於表示，對生物體不引起顯著刺激且不廢除所施用的化合物的生物活性和性能的載體或稀釋劑。佐劑被包含在這些短語下。在一個實施例中，在藥學上可接受的載體中包含的成分之一可以是例如聚乙二醇(PEG)，即在有機和水性介質中均具有寬溶解度範圍的生物相容的聚合物。

【0208】 在另一個實施例中，“賦形劑”表示加入醫藥組合物中以進一步促進活性成分施用的惰性物質。在一個實施例中，賦形劑包括碳酸鈣、磷酸鈣、各種糖和各種類型的澱粉、纖維素衍生物、明膠、植物油和聚乙二醇。

【0209】 藥物的配製和施用技術參見“Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA，最新版，其係以引用方式併入本文中。

【0210】 本發明預見到劑量範圍的不同實施例。在一個實施例中，本發明的經工程改造的凝血因子的劑量是在 0.005-100 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.005-5 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.01-50 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.1-20 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.1-10 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.01-5 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.001-0.01 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.001-0.1 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.1-5 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.5-50 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.2-15 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 0.8-65 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 1-50 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 5-10 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 8-15 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 10-20 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 20-40 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 60-120 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 12-40 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 40-60 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 50-100 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 1-60 mg/天的範圍內。在另一個實施例

中，所述劑量是在 15-25 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 5-10 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 55-65 mg/天的範圍內。

【0211】 在另一個實施例中，所述劑量是在 50-500 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 50-150 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 100-200 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 150-250 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 200-300 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 250-400 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 300-500 mg/天的範圍內。在另一個實施例中，所述劑量是在 350-500 mg/天的範圍內。

【0212】 在一個實施例中，所述劑量是 20 mg/天。在一個實施例中，所述劑量是 30 mg/天。在一個實施例中，所述劑量是 40 mg/天。在一個實施例中，所述劑量是 50 mg/天。在一個實施例中，所述劑量是 0.01 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 0.1 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 1 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 0.530 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 0.05 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 50 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 10 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 20-70 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 5 mg/天。

【0213】 在一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子的劑量是 1-5 mg/天。在一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子的劑量是 1-3 mg/天。在另一個實施例中，所述 CTP 修飾的凝血因子的劑量是 2 mg/天。

【0214】 在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/2 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/3 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/4 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/5 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/6 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/周。在另一個實施例中，所述劑

量是 1-90 mg/9 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/11 天。在另一個實施例中，所述劑量是 1-90 mg/14 天。

【0215】 在另一個實施例中，所述凝血因子劑量是 10-50 mg/天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/2 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/3 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/4 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 微克/5 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/6 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/周。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/9 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/11 天。在另一個實施例中，所述劑量是 10-50 mg/14 天。

【0216】 在另一個實施例中，將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽配製成鼻內劑型。在另一個實施例中，將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽配製成可注射劑型。在另一個實施例中，以在 0.0001 mg 至 0.6 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 0.001 mg 至 0.005 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 0.005 mg 至 0.01 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 0.01 mg 至 0.3mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 0.2 mg 至 0.6 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，所述凝血因子在它的胺基端上不具有 CTP。

【0217】 在另一個實施例中，以在 1-100 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 10-80 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 20-60 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 10-

50 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 40-80 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 10-30 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 30-60 微克範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。

【0218】 在另一個實施例中，以在 0.2 mg 至 2 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 2 mg 至 6 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 4 mg 至 10 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，以在 5 mg 至 15 mg 範圍內的劑量將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。

【0219】 於一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以自 10 µg/kg 至 1000 µg/kg 的劑量範圍施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以自 25 µg/kg 至 600 µg/kg 的劑量範圍施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以自 50 µg/kg 至 400 µg/kg 的劑量範圍施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 25 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 50 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 100 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 200 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 300 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 400 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 500 µg/kg 的劑量施予一個體。於另一實施例中，由 CTP 修飾的凝血因子係以約 600 µg/kg 的劑量施予一個體。

【0220】 在一個實施例中，CTP 修飾的 FVIIa 的劑量占在相同時間段內在患者的重組 FVIIa (NovoSeven®)的推薦劑量中施用的 FVIIa 的量的 50%。在一個實施例中，CTP 修飾的 FVII 的劑量占在相同時間段內在患者的重組 FVII 的推薦劑量中施用的 FVII 的量的 50%。例如，如果在手術前或手術後以每 2 小時 90 微克/kg 的劑量將 NovoSeven®施用給患者(即，對於 85 kg 的患者，每 2 小時 7.65 mg，或在 12 小時時段內分成 6 次給藥的 45.9 mg)，可以在為患者的重組 FVIIa 的 12-小時給藥的 50%的劑量(即，在經 12-小時時段內施用一次的 23 mg 的劑量)施用本發明的 CTP 修飾的凝血因子。

【0221】 在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 45%。在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 10%。在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 25%。在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 35%。在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 75%。在另一個實施例中，CTP 修飾的凝血因子的劑量使得它含有使用未經 CTP 修飾的凝血因子施用的凝血因子的量的 100%。但是，即使所述劑量含有與未經 CTP 修飾的凝血因子相同量的凝血因子(例如 FIX)，它對於個體仍然是有利的，因為它將以更低的頻率施用，這是由於它與重組凝血因子相比增加的半衰期。

【0222】 在另一個實施例中，綴合的凝血因子的治療有效量是在 10 µg/Kg-500 µg/Kg 的 FVIIa 之間。在另一個實施例中，綴合的凝血因子的治療有效量是每天 1 次施用的 150-250 IU/千克體重。在另一個實施例中，以對於通過多種方式施用給人患者而言有效的強度，配製包含綴合的凝血因

子的醫藥組合物。

【0223】 在一個實施例中，每週 1 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每週 2 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每兩星期 1 次地(每兩周 1 次地)將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每月 2 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每月 1 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每天 1 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。在另一個實施例中，每兩天 1 次地將 CTP 修飾的凝血因子施用給個體。

【0224】 在另一個實施例中，每三天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每四天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每五天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每六天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每 7-14 天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每 10-20 天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每 5-15 天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。在另一個實施例中，每 15-30 天 1 次地將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽施用給個體。

【0225】 在另一個實施例中，本發明的方法包括增加在凝血因子療法使用中的順應性，所述方法包括：給有此需要的個體提供包含凝血因子和連接至所述凝血因子的羧基端的至少一個絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)的多肽，由此增加在凝血因子療法使用中的順應性。

【0226】 在另一個實施例中，本發明的方法包括：增加需要凝血因子療法的罹患慢性疾病的患者的順應性。在另一個實施例中，本發明的方法能夠通過用如上文所述的 CTP 修飾凝血因子來降低凝血因子的施用頻率。

【0227】 在另一個實施例中，術語順應性包括堅持性(adherence)。在另一個實施例中，本發明的方法包括：通過降低凝血因子的施用頻率來增加需要凝血因子療法的患者的順應性。在另一個實施例中，通過 CTP 修飾來實現凝血因子的施用頻率的降低，所述 CTP 修飾使得 CTP 修飾的凝血因子更穩定。在另一個實施例中，由於增加凝血因子的 $T_{1/2}$ 而實現凝血因子的施用頻率的降低。在另一個實施例中，由於增加凝血因子的清除時間或降低凝血因子的清除率而實現凝血因子的施用頻率的降低。

【0228】 在另一個實施例中，由於增加凝血因子的 AUC 測量而實現凝血因子的施用頻率的降低。

【0229】 在另一個實施例中，本文提供了一種降低凝血因子的施用頻率的方法，所述方法包括下述步驟：將 1-10 個 CTP 連接至所述凝血因子的羧基端，由此降低凝血因子的施用頻率。在另一個實施例中，本文提供了一種降低凝血因子的施用頻率的方法，所述方法包括下述步驟：將 1-5 個 CTP 連接至所述凝血因子的羧基端，由此降低凝血因子的施用頻率。在另一個實施例中，本文提供了一種降低凝血因子的施用頻率的方法，所述方法包括下述步驟：將 3 個 CTP 連接至凝血因子的羧基端，由此降低凝血因子的施用頻率。在另一個實施例中，本文提供了一種降低凝血因子的施用頻率的方法，所述方法包括下述步驟：將 3-5 個 CTP 連接至凝血因子的羧基端，由此降低凝血因子的施用頻率。

【0230】 在另一個實施例中，本文提供了一種增加在凝血因子療法使用中的順應性的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至所述凝血因子的羧基端的 1-10 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此增加在凝血因子療法使用中的順應性。在另一個實施例中，本文提供了一種增加在凝血因子療法使用中的順應性的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 1-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此增加在凝血因

子療法使用中的順應性。在另一個實施例中，本文提供了一種增加在凝血因子療法使用中的順應性的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此增加在凝血因子療法使用中的順應性。在另一個實施例中，本文提供了一種增加在凝血因子療法使用中的順應性的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此增加在凝血因子療法使用中的順應性。

【0231】 在另一個實施例中，本文提供了一種預防或治療個體中的血液凝結或凝血病症的方法，所述方法包括：給所述個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至所述凝血因子的羧基端的 1-10 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此治療所述個體中的血液凝結或凝血病症。在另一個實施例中，本文提供了一種預防或治療個體中的血液凝結或凝血病症的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 1-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此預防或治療所述個體中的血液凝結或凝血病症。在另一個實施例中，本文提供了一種預防或治療個體中的血液凝結或凝血病症的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此預防或治療所述個體中的血液凝結或凝血病症。

【0232】 在另一個實施例中，本文提供了一種預防個體的血友病的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此預防所述個體中的血友病。在另一個實施例中，本文提供了一種預防個體的血友病的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由

此預防所述個體中的血友病。

【0233】 在另一個實施例中，本文提供的組合物在皮下施用以後會令人驚訝地更有效地被吸收進血流中(參見 PCT/IL2016/050645，其全文係以引用方式併入本文中)。能夠皮下地施用 FVIIa 是一個優點，因為它可以用於預防性施用。皮下注射對於患者而言也更易於自己注射，並且當患者非常年輕且他們的靜脈較小和難以發現時是優點。

【0234】 在另一個實施例中，本文提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給所述個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至所述凝血因子的羧基端的 1-10 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此治療所述個體中的血友病。在另一個實施例中，本文提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 1-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此治療所述個體中的血友病。在另一個實施例中，本文提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此治療所述個體中的血友病。在另一個實施例中，本文提供了一種治療個體中的血友病的方法，所述方法包括：給有此需要的個體提供多肽，所述多肽包含凝血因子和連接至凝血因子的羧基端的 3-5 個絨毛膜促性腺激素羧基端肽，由此治療所述個體中的血友病。

【0235】 在一個實施例中，口服施用包括單位劑型，包括片劑、膠囊劑、錠劑、咀嚼片劑、懸浮液、乳劑等。這樣的單位劑型包含安全且有效量的期望的本發明的凝血因子，在一個實施例中，其中的每一種是約 0.7 或 3.5 mg 至約 280 mg/70 kg，或在另一個實施例中，約 0.5 或 10 mg 至約 210 mg/70 kg。適合於製備用於口服施用的單位劑型的藥學上可接受的載體是本領域眾所周知的。在某些實施例中，片劑通常包含常規藥學上相容的佐劑如惰性稀釋劑，諸如碳酸鈣、碳酸鈉、甘露醇、乳糖和纖維素；黏合劑

諸如澱粉、明膠和蔗糖；崩解劑諸如澱粉、海藻酸和交聯羧甲纖維素(croscarmellose)；潤滑劑諸如硬脂酸鎂、硬脂酸和滑石粉。在一個實施例中，助流劑諸如二氧化矽可以用於改善粉末混合物的流動特性。在一個實施例中，為了外觀，可以加入著色劑諸如 FD&C 染料。甜味劑和調味劑，諸如阿司帕坦、糖精、薄荷醇、薄荷和果味調味劑，是咀嚼片劑的有用佐劑。膠囊劑通常包含以上公開的一種或多種固體稀釋劑。在某些實施例中，載體組分的選擇取決於後續考慮事項，如味道、成本和儲存穩定性，其對於本發明的目的而言不是關鍵性的，且可以由本領域技術人員容易地選擇。

【0236】 在一個實施例中，口服劑型包含預定義的釋放特性。在一個實施例中，本發明的口服劑型包含延長釋放片劑、膠囊劑、錠劑或咀嚼片劑。在一個實施例中，本發明的口服劑型包含緩釋片劑、膠囊劑、錠劑或咀嚼片劑。在一個實施例中，本發明的口服劑型包含立即釋放片劑、膠囊劑、錠劑或咀嚼片劑。在一個實施例中，如本領域技術人員已知的，根據藥物活性成分的期望釋放特性配製所述口服劑型。

【0237】 在某些實施例中，口服組合物包含液體溶液、乳劑、懸浮液等。在某些實施例中，適合於製備這樣的組合物的藥學上可接受的載體是本領域眾所周知的。在某些實施例中，液體口服組合物包含約 0.001%至約 0.933%的一種或多種期望的化合物，或在另一個實施例中，約 0.01%至約 10%。

【0238】 在某些實施例中，用於本發明的方法中的組合物包含溶液或乳劑，在某些實施例中，其為包含安全且有效量的本發明化合物和任選的意圖用於局部鼻內施用的其它化合物的水溶液或乳劑。在某些實施例中，所述組合物包含約 0.001%至約 10.0% (w/v)的主題化合物，更優選約 0.1%至約 2.0%，其用於通過鼻內途徑全身性遞送所述化合物。

【0239】 在另一個實施例中，將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽注射進肌肉中(肌肉內注射)。在另一個實施例中，將包含凝血因子和

至少一個 CTP 單元的多肽注射在皮膚下面(皮下注射)。在另一個實施例中，將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽注射進肌肉中。在另一個實施例中，將包含凝血因子和至少一個 CTP 單元的多肽注射進皮膚中。在另一個實施例中，通過全身施用來施用如本文中所述的凝血因子。在另一個實施例中，通過靜脈內注射來施用如本文中所述的凝血因子。在另一個實施例中，施用可以是胃腸外的、肺的、口服的、局部的、真皮內的、肌肉內的、腹膜內的、靜脈內的、皮下的、鼻內的、經鼻的、眼內的、眼的、硬膜外的、含服的、直腸的、經黏膜的、腸或胃腸外的遞送，包括骨髓內注射以及鞘內或直接心室內施用。

【0240】 在另一個實施例中，以局部方式而不是全身性方式施用製劑，例如，通過將製劑直接注射進患者身體的特定區域中。

【0241】 在一個實施例中，所述施用途徑可以是腸內的。在另一個實施例中，所述途徑可以是結膜的、透皮的、真皮內的、動脈內的、陰道的、直腸的、腫瘤內的、經癌灶(paracancer)、經黏膜的、肌肉內的、血管內的、心室內的、顱內的、鼻內的、舌下的或其組合。

【0242】 在另一個實施例中，通過靜脈內、動脈內或肌肉內注射液體製劑來施用所述醫藥組合物及醫藥調配物。在某些實施例中，液體製劑包括溶液、懸浮液、分散體、乳劑、油等。在一個實施例中，靜脈內地施用所述醫藥組合物及醫藥調配物，並因此將其配製成適合於靜脈內施用的形式。在另一個實施例中，動脈內地施用所述醫藥組合物及醫藥調配物，並因此將其配製成適合於動脈內施用的形式。在另一個實施例中，肌內地施用所述醫藥組合物及醫藥調配物，並因此將其配製成適合於肌肉內施用的形式。

【0243】 此外，在另一個實施例中，將所述醫藥組合物及醫藥調配物局部施用於身體表面，並因此將其配製成適合於局部施用的形式。合適的局部製劑包括凝膠、軟膏劑、乳膏劑、洗劑、滴劑等。對於局部施用，將本文所揭露的化合物與一種或多種額外的適當治療劑組合，製備，和作為在

有或無藥用載體的生理上可接受的稀釋劑中的溶液、懸浮液或乳劑來施用。

【0244】 在一個實施例中，通過本領域眾所周知的方法來製備醫藥組合物及醫藥調配物，例如，借助於常規混合、溶解、粒化、做糖衣丸、磨細、乳化、包封、截留或凍乾過程製備。

【0245】 在一個實施例中，使用促進將所述活性成分加工成可在藥學上使用的製品的一種或多種生理上可接受的載體(包括賦形劑和助劑)，以常規方式配製根據本發明使用的醫藥組合物及醫藥調配物。在一個實施例中，製劑取決於選擇的施用途徑。

【0246】 在一個實施例中，在水溶液中配製本發明的注射劑。在一個實施例中，在生理上相容的緩衝液(諸如漢克氏溶液、林格氏溶液或生理鹽水緩衝液)中配製本發明的注射劑。在某些實施例中，對於經黏膜施用，在所述製劑中使用適合要透過的屏障的滲透劑。所述滲透劑在本領域內是公知的。

【0247】 在一個實施例中，將本文所述的製品配製為用於胃腸外施用，例如，通過快速推注或連續輸注。在某些實施例中，注射用製劑呈單位劑型，例如在安瓿中或在多劑量容器中，其中視情況添加有防腐劑。在某些實施例中，組合物是在油性或水性媒介物中的懸浮液、溶液或乳劑，且含有配製劑諸如助懸劑、穩定劑和/或分散劑。

【0248】 在某些實施例中，所述組合物還包含：防腐劑，諸如苯紮氯銨和硫柳汞等；螯合劑，諸如依地酸鈉等；緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽和乙酸鹽；張度劑，諸如氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露醇等；抗氧化劑，諸如抗壞血酸、乙醯基胱胺酸、焦亞硫酸鈉等；芳香劑；黏度調節劑，諸如聚合物，包括纖維素及其衍生物；和聚乙烯醇以及根據需要調節這些水性組合物的 pH 的酸和鹼。在某些實施例中，所述組合物還包含局部麻醉劑或其它活性物。所述組合物可以用作噴霧劑、霧劑、滴劑等。

【0249】 在某些實施例中，用於胃腸外施用的醫藥組合物及醫藥調配物

包括水溶性形式的活性製品的水溶液。另外，在某些實施例中，將活性成分的懸浮液製備成適當的基於油或水的注射懸浮液。在某些實施例中，合適的親脂溶劑或媒介物包括：脂肪油諸如芝麻油，或合成的脂肪酸酯諸如油酸乙酯、甘油三酯或脂質體。在某些實施例中，水性注射懸浮液含有增加所述懸浮液的黏度的物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或葡聚糖。在另一個實施例中，所述懸浮液還含有合適的穩定劑或增加活性成分的溶解度以允許製備高濃縮溶液的試劑。

【0250】 在另一個實施例中，可以在微脂粒、特別是在脂質體中遞送所述活性化合物（參見 Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat 等人, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein 及 Fidler (編), Liss, New York, 第 353-365 頁 (1989); Lopez-Berestein, 文獻同上, 第 317-327 頁; J. E. Diederichs 等人, *Pharm./nd.* 56 (1994) 267- 275）。

【0251】 在另一個實施例中，將在控釋系統中遞送的醫藥組合物配製成用於靜脈內輸注、可植入的滲透泵、透皮貼劑、脂質體或其它施用模式。在一個實施例中，可使用泵（參見 Langer, 出處同上； Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald 等人, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek 等人, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)）。在另一個實施例中，可以使用聚合材料。在另一個實施例中，可以將控釋系統置於治療靶標(即，腦)的附近，因此僅需要全身劑量的一部分（參見(例如) Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 出處同上, 第 2 卷, 第 115-138 頁 (1984)）。在 Langer 的綜述(*Science* 249:1527-1533 (1990))中討論了其它控釋系統。

【0252】 在某些實施例中，所述活性成分是呈粉末形式，其用於在使用之前用合適的媒介物（例如，無菌的、無熱原的基於水的溶液）構建。在某些實施例中，將組合物配製用於霧化和吸入施用。在另一個實施例中，將組合物包含在具有附帶的霧化裝置的容器中。

【0253】 在一個實施例中，使用例如常規栓劑基質諸如可哥脂或其它甘油酯，將本發明的製品配製成直腸組合物諸如栓劑或保留灌腸劑。

【0254】 在某些實施例中，適用於用在本發明的上下文中的醫藥組合物及醫藥調配物包括這樣的組合物：其中含有有效地實現預期目的的量的活性成分。在某些實施例中，治療有效量是指有效地預防、減輕或改善疾病症狀或延長接受治療的個體的生存時間的活性成分的量。

【0255】 在一個實施例中，治療有效量的確定完全是在本領域技術人員的能力範圍內。

【0256】 可以充當藥學上可接受的載體或其組分的物質的一些例子是：糖類，諸如乳糖、葡萄糖和蔗糖；澱粉類，諸如玉米澱粉和馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素和甲基纖維素；黃耆膠粉末；麥芽；明膠；滑石粉；固體潤滑劑，諸如硬脂酸和硬脂酸鎂；硫酸鈣；植物油，諸如花生油、棉籽油、芝麻油、橄欖油、玉米油和可哥油；多元醇諸如丙二醇、甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；海藻酸；乳化劑，諸如 Tween™ 商標乳化劑；潤濕劑，諸如月桂基硫酸鈉；著色劑；調味劑；壓片劑、穩定劑；抗氧化劑；防腐劑；無熱原水；等張鹽水；和磷酸鹽緩衝溶液。要與所述化合物聯合使用的藥學上可接受的載體的選擇基本上取決於要施用所述化合物的方式。在一個實施例中，如果要注射主題化合物，那麼所述藥學上可接受的載體是含有血液相容的助懸劑的無菌生理鹽水，其 pH 已經被調節至約 7.4。

【0257】 另外，所述組合物還包含：黏合劑(例如阿拉伯膠、玉米澱粉、明膠、卡波姆、乙基纖維素、瓜爾膠、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚維酮)，崩解劑(例如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、海藻酸、二氧化矽、交聯羧甲基纖維素鈉、交聚維酮、瓜爾膠、澱粉羥乙酸鈉)，不同 pH 和離子濃度的緩衝液(例如，Tris-HCl、乙酸鹽、磷酸鹽)，用於防止吸收至表面的添加劑諸如白蛋白或明膠，去污劑(例如，Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、

膽汁酸鹽)，蛋白酶抑制劑、表面活性劑(例如月桂基硫酸鈉)，滲透增強劑、增溶劑(例如，甘油、聚乙烯甘油)，抗氧化劑(例如，抗壞血酸、偏亞硫酸氫鈉、丁羥茴香醚)，穩定劑(例如羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素)，增黏劑(例如卡波姆、膠體二氧化矽、乙基纖維素、瓜爾膠)，甜味劑(例如阿司帕坦、檸檬酸)，防腐劑(例如，硫柳汞、苯甲醇、對羥基苯甲酸酯)，潤滑劑(例如硬脂酸、硬脂酸鎂、聚乙二醇、月桂基硫酸鈉)，助流劑(例如膠體二氧化矽)，塑化劑(例如鄰苯二甲酸二乙酯、檸檬酸三乙酯)，乳化劑(例如卡波姆、羥丙基纖維素、月桂基硫酸鈉)，聚合物包衣劑(例如，泊洛沙姆或泊洛沙胺)，包衣劑和成膜劑(例如乙基纖維素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐劑。

【0258】 糖漿劑、酏劑、乳劑和懸浮液的載體的典型組分包括乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、液體蔗糖、山梨醇和水。對於懸浮液而言，典型的助懸劑包括甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、纖維素(例如 Avicel™、RC-591)、黃蓍膠和海藻酸鈉；典型的潤濕劑包括卵磷脂和聚氧化乙烯脫水山梨糖醇(例如聚山梨酯 80)。典型的防腐劑包括對羥基苯甲酸甲酯和苯甲酸鈉。在另一個實施例中，口服液體組合物還含有上面公開的一種或多種組分諸如甜味劑、調味劑和著色劑。

【0259】 所述組合物還包括將活性物質摻入在聚合物(諸如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝膠等)的微粒製品的內部或表面上，或摻入在脂質體、微乳劑、膠束、單層或多層微脂粒、紅血球血影或原生質球狀體上。這樣的組合物將影響物理狀態、溶解度、穩定性、體內釋放速率和體內清除速率。

【0260】 本發明還包括用聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺)包被的微粒組合物，以及偶聯至針對組織特異性受體、配體或抗原的抗體的化合物或偶聯至組織特異性受體的配體的化合物。

【0261】 在某些實施例中，通過共價連接水溶性聚合物來修飾化合物，

所述水溶性聚合物是諸如聚乙二醇、聚乙二醇與聚丙二醇的共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯胺酸。在另一個實施例中，與相應的未修飾的化合物相比，所述修飾的化合物在靜脈內注射之後表現出在血液中實質上更長的半衰期。在一個實施例中，修飾也會增加所述化合物在水溶液中的溶解度，消除聚集，增強所述化合物的物理和化學穩定性，並極大地降低所述化合物的免疫原性和反應性。在另一個實施例中，通過與未修飾的化合物相比以更低頻率或更低劑量施用這樣的聚合物-化合物加合物，實現期望的體內生物活性。

【0262】 在某些實施例中，最初可以從體外測定估算有效量或劑量的製品。在一個實施例中，可以在動物模型中配製劑量，且這樣的資訊可以用來更準確地確定在人類中有用的劑量。

【0263】 在一個實施例中，通過標準製藥規程在體外、在細胞培養物或實驗動物中可以確定本文描述的活性成分的毒性和治療效果。在一個實施例中，可以將得自這些體外和細胞培養測定和動物研究的資料用於配置人用的劑量範圍。在一個實施例中，劑量隨採用的劑型和利用的施用途徑而變化。在一個實施例中，精確的製劑、施用途徑和劑量可以由個別醫師考慮到患者的狀況來選擇[參見(例如), Fingl 等人, (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics",第 1 章第 1 頁]。

【0264】 在一個實施例中，取決於要治療的病症的嚴重程度和應答性，給藥可以是單次或多次給藥，療程持續幾天至幾周，或直到實現治癒或達到疾病狀態的減輕。

【0265】 在一個實施例中，組合物的施用量當然取決於治療的個體、疾病嚴重程度、施用方式、處方醫師的判斷等。

【0266】 在一個實施例中，還製備組合物，包括在相容的藥用載體中配製的本發明製品，其置於適當的容器中，並標示指定的病症的治療。

【0267】 在另一個實施例中，如本文中所述的凝血因子是與以下物質組

合的低壓凍乾的(即，冷凍乾燥的)製品：複合的有機賦形劑和穩定劑諸如非離子表面活性劑(即，表面活性劑)、各種糖、有機多元醇和/或人血清白蛋白。在另一個實施例中，醫藥組合物包含在無菌注射用水中低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子。在另一個實施例中，醫藥組合物包含在注射用無菌 PBS 中低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子。在另一個實施例中，醫藥組合物包含在注射用無菌 0.9% NaCl 中低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子。

【0268】 在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含如本文中所述的凝血因子和複合載體諸如人血清白蛋白、多元醇、糖和陰離子表面活性穩定劑。在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含如本文中所述的凝血因子和乳糖酸和乙酸鹽/甘胺酸緩衝液。在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含如本文中所述的凝血因子和增加干擾素成分在水中的溶解度的胺基酸(諸如精胺酸或谷胺酸)。在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子和甘胺酸或人血清白蛋白(HSA)、緩衝劑(例如乙酸鹽)和等滲劑(例如 NaCl)。在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子和磷酸鹽緩衝劑、甘胺酸和 HSA。

【0269】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物當置於具有約 4 至 7.2 之間的 pH 的緩衝溶液中時是穩定的。在另一個實施例中，包含凝血因子的醫藥組合物是在具有約 4 至 8.5 之間的 pH 的緩衝溶液中。在另一個實施例中，包含凝血因子的醫藥組合物是在具有約 6 至 7 之間的 pH 的緩衝溶液中。在另一個實施例中，包含凝血因子的醫藥組合物是在具有約 6.5 的 pH 的緩衝溶液中。在另一個實施例中，包含凝血因子的醫藥組合物是在具有約 6.4 的 pH 的緩衝溶液中。在另一個實施例中，用作為穩定劑的胺基酸且在某些情況下用鹽(如果所述胺基酸不含有帶電荷的側鏈)來穩定包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物。

【0270】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合

物是這樣的液體組合物：其包含約 0.3 重量%至 5 重量%之間的穩定劑，所述穩定劑是胺基酸。

【0271】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物提供了給藥準確度和產品安全性。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物提供了用於可注射施用中的生物學上有活性的、穩定的液體製劑。在另一個實施例中，所述醫藥組合物包含未低壓凍乾的如本文中所述的凝血因子。

【0272】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物提供了這樣的液體製劑：其允許以液體狀態長期儲存，從而促進在施用之前的儲存和運輸。

【0273】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含固體脂質作為基體材料。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的可注射醫藥組合物包含固體脂質作為基體材料。在另一個實施例中，如 Speiser (Speiser 等人, Pharm. Res. 8 (1991) 47-54)所述通過噴霧冷凝來生產脂質微粒，隨後將脂質納米球用於口服施用(Speiser EP 0167825 (1990))。在另一個實施例中，使用的脂質被身體較好地耐受(例如由存在於胃腸外營養物的乳劑中的脂肪酸組成的甘油酯)。

【0274】 在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含高分子微粒。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含納米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含脂質體。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含脂質乳劑。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含微球。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含脂質納米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包含含有兩親脂質的脂質納米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文中所述的凝血因子的醫藥組合物包

含含有藥物、脂質基質和表面活性劑的脂質納米顆粒。在另一個實施例中，所述脂質基質具有為至少 50% (w/w) 的甘油單酯含量。

【0275】 在一個實施例中，本文中所揭露之組合物存在於包裝或分配器裝置中，諸如 FDA 批准的試劑組，其包含一個或更多個含有活性成分的單位劑型。在一個實施例中，所述包裝例如包含金屬或塑膠箔，諸如泡罩包。在一個實施例中，所述包裝或分配器裝置伴有施用說明書。在一個實施例中，所述包裝或分配器伴有與容器有關的公告，所述公告採用管理藥物的製備、使用或銷售的政府機構指定的形式，所述公告反映了所述機構對所述組合物的形式或人或獸施用的批准。在一個實施例中，所述公告是由美國食品和藥品管理局批准的關於處方藥的標籤或經批准的產品插頁。

【0276】 在一個實施例中，應當理解，本文中所揭露之凝血因子可以與額外活性劑一起提供給個體，以實現與用每種藥劑自身治療相比改善的治療效果。在另一個實施例中，採取措施(例如互補藥劑的施用和選擇)來避免與聯合治療有關的不利副作用。

製造

【0277】 於一實施例中，所揭露的是一種製造人類絨毛膜促性腺激素肽(CTP)修飾的因子 VIIa 多肽之方法，該方法包括以下步驟：(a) 以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並選擇性地分泌所述 CTP 修飾的 FVII；(b) 取得過度表現所述 CTP 修飾的因子 FVII 之細胞株；(c) 在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；(d) 採集所述含有細胞株之溶液；(e) 過濾所述含有細胞株之溶液以取得一澄清採集溶液；以及(f) 從該澄清採集溶液純化並活化所述 CTP 修飾的 FVII，以取得一個具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVIIa 之純化蛋白溶液，藉以製造之絨毛膜促性腺激素肽(CTP)修飾的因子 VIIa 多肽。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 FVII 係被分泌。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 FVII 係未被分泌。於 CTP

修飾的因子 FVII 之製造中，轉染是一個早期步驟。一旦選擇出最後有高度表現的殖株，每次的生產製造係包含解凍主細胞庫(MCB)、擴增、採集及純化（參實例 3，步驟 1-5 係描述通過採集而擴增殖株；步驟 6-14 係描述純化與活化）。於一實施例中，所揭露的是一種製造人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽之方法，其中該多肽係包括三個以串聯方式連接至 FVII 的 C 端之 CTP 分子，該方法包括以下步驟：以一表現載體穩定地轉染一預定數量的細胞，該表現載體包括一編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之編碼部分，其中所述經轉染的細胞係表現並分泌所述 CTP 修飾的 FVII；取得過度表現所述 CTP 修飾的 FVII 之細胞株；在溶液中擴增該等細胞株至一預定規模；採集所述含有細胞株之溶液；過濾所述含有細胞株之溶液以取得一個含有所述 CTP 修飾的 FVII 之澄清採集溶液；以及從該澄清採集溶液純化並活化所述 CTP 修飾的 FVII，以取得一個具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVIIa 之純化蛋白溶液，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 係包括以下至少一者：

- a. 低度氧化形式；
- b. 高比例的羧化麩胺酸殘基；
- c. 至少 60%帶電荷的 N 型糖鏈；或
- d. 至少 10,500 U/mg 的效價；

藉以製造 CTP 修飾的 FVIIa，且其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 的胺基酸序列係陳述於 SEQ ID NO: 7 中。

【0278】 在一個實施例中，將本文中所揭露之聚核苷酸插入表現載體(即，核酸構建體)中，以實現重組多肽的表現。在一個實施例中，本發明的表現載體包括額外序列，所述額外序列使得該載體適合於在原核生物中複製和整合。在一個實施例中，本文中所揭露之表現載體包括額外序列，所述額外序列使得該載體適合於在真核生物中複製和整合。在一個實施例中，本

發明的表現載體包括穿梭載體，所述穿梭載體使得該載體適合於在原核生物和真核生物二者中複製和整合。在某些實施例中，選殖載體包含轉錄和轉譯起始序列(例如，啟動子、增強子)以及轉錄和轉譯終止子(例如，聚腺苷酸化信號)。

【0279】 在一個實施例中，製造 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之方法係包括如下步驟：包括使用一表現載體，其中所述表現載體包括啟動子、CTP 修飾的 FVII 多肽之編碼序列、以及聚腺苷酸化序列。在另一實施例中，該聚腺苷酸化序列為猴病毒(SV) 40 聚腺苷酸化序列。

【0280】 在一個實施例中，多種原核或真核細胞可以用作宿主表現系統來表現本文中所揭露之多肽。在某些實施例中，這些包含（但不限於）：微生物，諸如用含有多肽編碼序列的重組噬菌體 DNA、質體 DNA 或黏質體 DNA 表現載體轉化的細菌；用含有多肽編碼序列的重組酵母表現載體轉化的酵母；用重組病毒表現載體(例如，花椰菜花葉病毒、CaMV；煙草花葉病毒、TMV)感染的或用含有多肽編碼序列的重組質粒表現載體(諸如 Ti 質粒)轉化的植物細胞系統。

【0281】 在一個實施例中，使用非細菌表現系統(例如哺乳動物表現系統，諸如 CHO 細胞或衍生自 CHO 細胞之細胞)以表現本文揭示之多肽。在一個實施例中，用於在哺乳動物細胞中表現本文揭示之聚核苷酸的表現載體為包括 CMV 啟動子及新黴素抗性基因之 pCI-DHFR 載體。

【0282】 在一個實施例中，本發明的表現載體可以進一步包括額外聚核苷酸序列，其允許例如從單一 mRNA 轉譯幾種蛋白，諸如內核糖體進入位點(IRES)和用於啟動子嵌合多肽的基因組整合的序列。

【0283】 在某些實施例中，哺乳動物表現載體包含(但不限於)：pcDNA3、pcDNA3.1(±)、pGL3、pZeoSV2(±)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81 (可得自 Invitrogen)、pCI (可得自 Promega)、pMbac、pPbac、pBK-

RSV 和 pBK-CMV (可得自 Strategene)、pTRES (可得自 Clontech)和其衍生物。

【0284】 在某些實施例中，藉由本發明所揭露方法來使用含有來自真核病毒(諸如逆轉錄病毒)的調節元件的表現載體。SV40 載體包括 pSVT7 和 pMT2。在某些實施例中，衍生自牛乳頭狀瘤病毒的載體包括 pBV-1MTHA，衍生自 Epstein Bar 病毒的載體包含 pHEBO 和 p2O5。其它示例性的載體包括 pMSG、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、桿狀病毒 pDSVE、和允許蛋白在啟動子指導下表現的任何其它載體，所述啟動子是 SV-40 早期啟動子、SV-40 晚期啟動子、金屬硫蛋白啟動子、鼠乳腺腫瘤病毒啟動子、勞斯肉瘤病毒啟動子、多角體蛋白啟動子或經證實在真核細胞中有效表現的其它啟動子。

【0285】 在一個實施例中，各種方法可用於將編碼本文揭示之 CTP 修飾的因子 VII 之表現載體引入至細胞中。用聚核苷酸或表現載體「轉染」真核宿主細胞會產生經基因修飾的細胞或轉殖基因細胞，其可藉由本領域中熟知的任何方法執行，且所述方法描述於例如 Sambrook 等人,《分子選殖：實驗室手冊(Molecular Cloning : A Laboratory Manual)》,冷泉港實驗室(Cold Springs Harbor Laboratory),紐約(1989,1992)，Ausubel 等人,《現行分子生物學方案(Current Protocols in Molecular Biology)》,John Wiley and Sons,馬里蘭州巴爾的摩(Baltimore,Md.)(1989)，Chang 等人,《體細胞基因療法(Somatic Gene Therapy)》,CRC Press,密西根州安娜堡(Ann Arbor,Mich.)(1995)，Vega 等人,《基因靶向(Gene Targeting)》,CRC Press,密西根州安娜堡(1995)，《載體：分子選殖載體及其用途之調查(Vectors : A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses)》,Butterworths,麻薩諸塞州波士頓(Boston Mass.)(1988)及 Gilboa 等人[《生物技術(Biotechniques)》4(6)：504-512,1986]且包含例如穩定或暫時轉染及電穿孔。另外，關於陽性-陰性選擇方法，參見美國專利第 5,464,764 號及第 5,487,992 號。轉染方法進一步包含(但不限於)脂質體介導的轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子(諸如 DEAE-聚葡萄糖)介導的

轉染、原生質體融合、病毒感染(包含重組病毒感染)及顯微注射。較佳地，轉染為穩定轉染。提供編碼本文揭示之相關肽之異質基因在特定宿主細胞株及類型中的最佳轉染頻率及表現之轉染方法為有利的。合適的方法可以藉由例行程式確定。為了穩定的轉染物，將構築體整合至宿主細胞之基因組或人造染色體/微染色體中或遊離地安置以便穩定維持在宿主細胞中。

【0286】 除非另外指明，否則本文揭示之實踐將利用在熟習此項技術者之技術範圍內之細胞生物學、分子生物學、細胞培養、免疫學及其類似學科之習知技術。此等技術充分揭示於當前文獻中。參見例如 Sambrook 等人,《分子選殖：實驗室手冊》,第 2 版,冷泉港實驗室出版社(Cold Springs Harbor Laboratory Press),紐約冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.)(1989)；Ausubel 等人,《現行分子生物學方案》(1987,最新)；Brown 編,《基礎分子生物學(Essential Molecular Biology)》,IRL Press(1991)；Goeddel 編,《基因表現技術(Gene Expression Technology)》,Academic Press(1991)；Bothwell 等人編,《真核基因之選殖及分析的方法(Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes)》,Bartlett Publ.(1990)；Wu 等人編,《重組 DNA 方法(Recombinant DNA Methodology)》,Academic Press(1989)；Kriegler,《基因轉移及表現(Gene Transfer and Expression)》,Stockton Press (1990)；McPherson 等人,《PCR：實用方法(PCR：A Practical Approach)》,IRL Press 於牛津大學出版社(Oxford University Press)(1991)；Gait 編,《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(1984)；Miller 及 Calos 編,《哺乳動物細胞之基因轉移載體(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)》(1987)；Butler 編,《哺乳動物細胞生物技術(Mammalian Cell Biotechnology)》(1991)；Pollard 等人編,《動物細胞培養(Animal Cell Culture)》,Humana Press(1990)；Freshney 等人編,《動物細胞之培養(Culture of Animal Cells)》,Alan R.Liss(1987)；Studzinski 編,《細胞生長及細胞凋亡，實用方法(Cell Growth and Apoptosis,A Practical Approach)》,IRL Press 於牛津大學出版社(1995)；Melamed 等人編,《流式細

胞儀及分選(Flow Cytometry and Sorting)》,Wiley-Liss(1990)；《當前細胞計數方案(Current Protocols in Cytometry)》,John Wiley & Sons,Inc.(最新)；Wirth 及 Hauser,《動物細胞之基因工程化(Genetic Engineering of Animals Cells)》,於：《生物技術(Biotechnology)》第 2 卷,Pühler 編,VCH,Weinheim 663-744；《酶學之系列方法(the series Methods of Enzymology)》(Academic Press,Inc.)；及 Harlow 等人編,《抗體：實驗室手冊(Antibodies : A Laboratory Manual)》(1987)。

【0287】 編碼 CTP 修飾的因子 VII 之相關異質基因可藉由各種方法，例如藉由病毒轉化、轉染或顯微注射引入至本文揭示之細胞中。相關異質基因可以線性 DNA 形式或以表現載體之一部分形式引入至細胞中。已知允許用於插入一個或多個異質基因及其表現之多個選殖位點的許多真核表現載體。商業供應商尤其包含諸如以下之公司：Stratagene,美國加州拉荷亞(La Jolla,Calif.,USA)；Invitrogen,美國加州喀斯巴德(Carlsbad,Calif.,USA)；Promega,美國威斯康辛州麥迪遜(Madison,Wis.,USA)或 BD Biosciences Clontech,美國加州帕羅奧多(Palo Alto,Calif.,USA)。用編碼一種或多種相關基因之 DNA 或表現載體轉染細胞係利用如例如 Sambrook 等人,1989 或 Ausubel 等人,1994 中所述之習知方法進行的。合適的轉染方法包含例如脂質體介導的轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子(例如 DEAE 聚葡萄糖)介導的轉染、原生質體融合、顯微注射及病毒感染。較佳地，進行穩定轉染，其中 DNA 分子整合至宿主細胞之基因組或人造染色體/微染色體中或以穩定方式遊離地含於宿主細胞中。在所討論之宿主細胞中得到一種或多種相關異質基因之最佳轉染頻率及表現的轉染方法為較佳的。

【0288】 在某些實施例中，通過病毒感染導入核酸會提供勝過其它方法(諸如脂質轉染和電穿孔)的幾個優點，因為由於病毒的感染性質可以獲得更高的轉染效率。

【0289】 在一個實施例中，應瞭解，本文揭示之多肽亦可自採用上文描

述的任何合適的授予模式(亦即活體內基因療法)授予個體之核酸構築體表現。在一個實施例中，核酸構築體按需要經由適當基因運載工具/方法(轉染、轉導、同源重組等)及表現系統引入至合適的細胞且接著經修飾細胞在培養物中擴增且返回至個體(即，離體基因療法)。

【0290】 相關異質基因通常在功能上連接至允許轉錄相關基因之啟動子及允許轉錄及轉譯(表現)相關基因或增加其效率的其他調控元件。

【0291】 熟習此項技術者將瞭解，術語「啟動子」可涵蓋會實現及控制功能上與其連接之基因或序列之轉錄的聚核苷酸序列。啟動子含有用於結合 RNA 聚合酶之識別序列及用於轉錄之起始位點(轉錄起始位點)。為了在某些細胞類型或宿主細胞中表現所期望的序列，必須選擇合適的功能啟動子。熟練技術人員將熟悉來自各種來源之多種啟動子，包含組成型、誘導型及可抑制型啟動子。其例如寄存在諸如 Genbank 之資料庫中，且可以來自商業或個體來源之獨立元件或在聚核苷酸序列中選殖之元件形式獲得。在誘導型啟動子中，啟動子之活性可回應於信號而減小或增大。誘導型啟動子之一個實例為四環素(tet)啟動子。此含有四環素操縱子序列(tetO)，其可由四環素調整的反式啟動蛋白(tTA)誘導。在四環素存在下，tTA 與 tetO 之結合得以抑制。其他誘導型啟動子之實例為 jun、fos、金屬硫蛋白及熱休克啟動子(亦參見 Sambrook,J.,Fritsch,E.F.及 Maniatis,T.,《分子選殖：實驗室手冊》冷泉港實驗室,紐約冷泉港,1989；Gossen,M.等人,《生物技術新觀點 (Curr Opin Biotech)》1994,5,516-520)。在尤其適用於在真核生物中高度表現之啟動子中，存在例如倉鼠之泛素/S27a 啟動子(WO 97/15664)、SV 40 早期啟動子、腺病毒主要晚期啟動子、小鼠金屬硫蛋白-1 啟動子、勞斯肉瘤病毒之長末端重複序列區及人類巨細胞病毒之早期啟動子。其他異質哺乳動物啟動子之實例為肌動蛋白、免疫球蛋白或熱休克啟動子。

【0292】 舉例而言，啟動子可在功能上連接至強化子序列以便增加轉錄活性。為此，可使用一種或多種強化子及/或強化子序列之數個複本，例如

CMV 或 SV40 強化子。舉例而言，啟動子可在功能上連接至強化子序列以便增加轉錄活性。為此，可使用一種或多種強化子及/或強化子序列之數個複本，例如 CMV 或 SV40 強化子。

【0293】 熟習此項技術者將瞭解，術語強化子可涵蓋在順式位置中作用於啟動子之活性且由此刺激在功能上與此啟動子連接之基因之轉錄的聚核苷酸序列。不同於啟動子，強化子之作用與位置及定向無關，且其可因此位於轉錄單元之前面或後面中，位於內含子內或甚至位於編碼區內。強化子可緊鄰轉錄單元及與啟動子距相當大的距離定位。亦可與啟動子具有實體及功能重疊。熟習此項技術者將瞭解來自各種來源之許多強化子(且寄存在諸如 Genbank 之資料庫中，例如 SV40 強化子、CMV 強化子、多瘤病毒強化子、腺病毒強化子)，其以獨立元件形式或在聚核苷酸序列中選殖之元件得到(例如寄存在 ATCC 或來自商業及個體來源)。許多啟動子序列亦含有強化子序列，諸如經常使用的 CMV 啟動子。人類 CMV 強化子為迄今鑑別之最強的強化子之一。誘導型強化子之一個實例為金屬硫蛋白強化子，其可由糖皮質激素或重金屬刺激。

【0294】 基本上，調控元件包含啟動子、強化子、終止及聚腺苷酸化信號及其他表現控制元件。已知誘導型及組成性調節序列均用於各種細胞類型。「轉錄調控元件」通常包括欲表現之基因序列之啟動子上游、轉錄起始及終止位點及聚腺苷酸化信號。

【0295】 熟習此項技術者將瞭解，術語「轉錄起始位點」可涵蓋構築體中之核酸，其對應於併入初始轉錄物(亦即，mRNA 前驅物)中之第一核酸。轉錄起始位點可與啟動子序列重疊。

【0296】 熟習此項技術者將瞭解，術語「轉錄終止位點」可涵蓋核苷酸序列，其通常在相關基因或待轉錄之基因區段之 3'端處，且其引起利用 RNA 聚合酶之轉錄終止。

【0297】 熟習此項技術者將瞭解，術語「聚腺苷酸化信號」可涵蓋訊息

序列，其引起在真核 mRNA 之 3'端處的特定位點處之裂解及在所裂解的 3'端處轉錄後併入約 100-200 個腺嘌呤核苷酸(polyA 尾)之序列。聚腺苷酸化信號包括在裂解位點上游約 10-30 個核苷酸處之序列 AATAAA 及位於下游的序列。各種聚腺苷酸化元件為已知的，諸如 tk polyA、SV40 晚期及早期 polyA 或 BGH polyA(例如描述在美國專利第 5,122,458 號中)。

【0298】 對於各欲表現之多肽，「轉譯調控元件」包括轉譯起始位點(AUG)、終止密碼子及 polyA 信號。為了最佳表現，合理的可為移除、添加或改變將表現之核酸序列之 5'非轉譯區及/或 3'非轉譯區，以便消除任何可能不合適的其他轉譯起始密碼子或其他可能在轉錄或表現數量下影響表現之序列。為了促進表現，緊接著起始密碼子之上游可替代地插入核糖體共同結合位點。為了製造分泌的多肽，相關基因通常含有編碼信號前驅肽之訊息序列，所述信號前驅肽將合成的多肽運送至 ER 膜且穿過 ER 膜。訊息序列通常但未必總是位於所分泌蛋白質之胺基末端，且其在蛋白質已滲透穿過 ER 膜之後由信號肽酶裂解。基因序列將通常但未必含有其自身訊息序列。若原生訊息序列不存在，則可以已知方式引入異質訊息序列。許多此類訊息序列為熟習此項技術者已知且寄存在諸如 GenBank 及 EMBL 之序列資料庫中。

【0299】 熟習此項技術者將瞭解，術語「多肽(polypeptides)」、「多肽(polypeptide)」或其語法上的等同表述可互換使用以涵蓋胺基酸序列或蛋白質，且可涵蓋任何長度之胺基酸之聚合物。此術語亦包含已藉由諸如醮基化、磷酸化、乙醯化或蛋白處理之反應經轉譯後修飾的蛋白質。多肽之結構可例如在保持其生物活性的同時藉由胺基酸之取代、缺失或插入及與其他蛋白質融合來修飾。

【0300】 為了在細胞中製造一種或多種相關基因產物，細胞可在允許表現相關基因之條件下生長在無血清培養基中及懸浮培養物中。若例如相關基因在組成型啟動子之控制下，則無需添加特殊誘導劑。舉例而言，若相

關基因之表現在誘導型啟動子之控制下，則必須將相應誘導劑以足夠但無毒性的濃度添加至細胞培養基中。細胞可視需要藉由多次繼代接種並轉移至合適的細胞培養器皿中來擴增。基因產物為或產生為細胞、膜結合或分泌產物。

【0301】 在一個實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VIIa 之步驟係包括以一個包括有編碼 CTP 修飾的因子 VII 之編碼部分的表現載體穩定轉染預定數量的細胞。在另一實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VIIa 之步驟係包括以一個包括有編碼所述 CTP 修飾的因子 VIIa 之編碼部分的表現載體穩定轉染細胞。在一個實施例中，細胞為 CHO 細胞。在另一實施例中，細胞為 DG44 細胞。在另一實施例中，細胞為本領域中已知適用於表現並分泌 CTP 修飾的因子 VIIa 之任何細胞。於一實施例中，所表現之 CTP 修飾的 FVII 係為缺少訊息肽之 FVII-CTP₃ 酶原。於另一實施例中，所表現之 CTP 修飾的 FVII 之胺基酸序列係陳述於 SEQ ID NO: 7 中。

【0302】 熟習此項技術者將瞭解，儘管 CTP 修飾的 FVII 可被表現為呈非活性狀態的酶原，所述酶原係可在純化製程期間或之後被活化。術語「酶原」係可與「CTP 修飾的 FVII/FVIIa」交換使用，且皆可涵蓋非活性及活性形式之 CTP 修飾的 FVII 多肽。同樣地，個別的 CTP 修飾的 FVII 多肽（例如 FVII/FVIIa-CTP₃）亦可使用專門名稱 FVII/FVIIa 來代表非活性或活性形式或該二者。於一實施例中，包括有經活化的 FVIIa-CTP₃ 之 CTP 修飾的多肽係包括由雙硫鍵連結的輕鏈與重鏈。

【0303】 在另一實施例中，經轉染的細胞係表現 CTP 修飾的因子 VII。在另一實施例中，所製造並表現之 FVII/FVIIa-CTP₃ 係由連接至所述因子 VII/VIIa 之羧基末端的兩個 CTP 及連接至所述因子 VII/VIIa 之胺基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在另一實施例中，所製造並表現之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 由連接至所述因子 VII/FVIIa 之羧基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在另一實施例中，CTP 修飾的因子 VII 係以

較高表現量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係經高度醣基化。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係經高度唾液酸化。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係具有高 O 型醣鏈含量。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係具有高 N 型醣鏈含量。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係具有高比例的羧基麩胺酸。如本文中所詳述，所述 CTP 修飾的因子 VIIa 具有不同的醣基化含量及方式。利用本文所揭示之方法製造的 CTP 修飾的因子 VIIa 可包含如本文所揭示之醣基化方式及含量中之任一者。通常，此處呈現之製造方法係提供一種具有高醣基化含量及較高之經醣基化的醣基化位點比例之 CTP 修飾的因子 VIIa。

【0304】 於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 2 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 4 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 5 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 6 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 8 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 10 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 12 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 14 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高 O 型醣鏈含量係至少 16 mol/mol。

【0305】 於另一實施例中，所述高程度或高含量的 O 型醣鏈係由本文中所揭露之製造過程中的上游製程所驅動。於另一實施例中，高程度或高含量的 O 型醣鏈係由本文中所揭露之製造過程中的殖株所驅動。於另一實施例中，高 O 型醣鏈含量或程度係經維持直至獲得最終的原料藥。

【0306】 於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係具有高唾液

酸含量。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 4 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 6 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 8 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 10 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 12 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 14 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 15 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 17 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 18 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 20 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 22 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 25 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 27 mol/mol。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高唾液酸含量係至少 30 mol/mol。

【0307】 於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 40%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 50%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 60%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 70%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 80%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 85%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 90%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比

例的羧基麩胺酸係至少 91%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 92%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 93%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 94%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 95%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 96%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 97%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 98%。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之高比例的羧基麩胺酸係至少 99%。熟習此項技術者將瞭解，羧基麩胺酸殘基係可相反地表述為缺少羧基麩胺酸殘基之結構域（缺少 Gla 的結構域）的%，其中，（例如）若高比率的 Gla 為 40%，那缺少 Gla 的結構域為 60%。

【0308】 在一個實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VII 之步驟包括獲得過度表現所述 CTP 修飾的因子 VII 之細胞植株。在另一實施例中，CTP 修飾的因子 VII 之表現係最佳的。在另一實施例中，表現量在 30-1500 mg/L 之間。在另一實施例中，表現量為至少 30 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 40 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 50 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 60 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 70 mg/L。在另一實施例中，表現量在 50-70 mg/L 之間。在另一實施例中，表現量為至少 200 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 300 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 400 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 500 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 600 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 700 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 800 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 900 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1000 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1100 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1200

mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1300 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1400 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少 1500 mg/L。在另一實施例中，這些殖株係於培養基中繁殖，以形成主細胞庫(MCB)及工作細胞庫(WCB)。在一個實施例中，步驟(c)中之殖株係獲自 MCB。在另一實施例中，步驟(c)中之殖株係獲自 WCB。

【0309】 CTP 修飾的 FVII 以分泌的基因產物形式獲自細胞培養基。然而，若蛋白質或多肽在無分泌信號之情況下表現，則基因產物亦可自細胞溶解物分離。為了獲得基本上不含其他重組蛋白及宿主細胞蛋白之純均質產物，進行習知純化程式。首先，時常自培養基或溶解物移除細胞及細胞殘渣。所期望的基因產物可接著自污染性可溶蛋白、多肽及核酸釋放，例如藉由在免疫親和力及離子交換管柱上分級分離、親和性管柱、乙醇沈澱、逆相 HPLC 或在葡聚糖凝膠、羥基磷灰石、二氧化矽上之層析或陽離子交換樹脂(諸如 DEAE)(參見本文中實例)進行。本領域中已知的一般方法學且引起由重組宿主細胞表現之異質蛋白純化的方法為熟練技術人員已知且描述於例如 Harris 等人(Harris 等人,《蛋白質純化：一種實踐方法(Protein Purification: A Practical Approach)》，Pickwood 及 Hames 編，IRL Press，Oxford, 1995)及 Scopes (Scopes, R.,《蛋白質純化(Protein Purification)》，Springer Verlag, 1988)之文獻中。此等方法可全部或部分用於本文所揭示之方法。

【0310】 在另一實施例中，本文揭示一種在無血清條件下在哺乳動物細胞中製備一種或多種 CTP 修飾的 FVII 之方法，其特徵在於：(i)哺乳動物細胞含有編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之基因；(ii)哺乳動物細胞在允許哺乳動物細胞複製之無血清條件下生長；(iii)在各種情況下，此等哺乳動物細胞中之至少一(1)種在無血清條件下沈積在細胞培養器皿中；(iv)適合沈積之哺乳動物細胞在無血清條件下複製；(v)所複製細胞在其中表現所述 CTP 修飾的 FVII 之無血清條件下培養；以及(vi)所述 CTP 修飾的 FVII 基因產物接著自細胞或培養物上清液分離且經純化及活化。在此方法之另一實施例中，哺

乳動物細胞為其中已引入所述 CTP 修飾的 FVII 之經轉染哺乳動物細胞。因此，本文揭示之方法亦關於一種製備重組基因產物之方法，其特徵在於在上文所述方法之步驟(i)之前，哺乳動物細胞經至少編碼所述 CTP 修飾的 FVII 之核酸轉染。相應哺乳動物細胞之穩定轉染為較佳的。

【0311】 無血清、無蛋白質或化學成分確定之培養基之實例包含例如商業可獲得的培養基哈姆氏 F12(Ham's F12)(西格瑪(Sigma)，德國戴森霍芬(Deisenhofen,DE))、RPMI 1640(西格瑪)、杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's medium，DMEM；西格瑪)、基本必需培養基(MEM；西格瑪)、伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's medium，IMDM；西格瑪)、CDCHO (Invitrogen，美國加州喀斯巴德)、CHO-S-SFMII (Invitrogen)、無血清 CHO 培養基(西格瑪)、CD-PowerCHO2 培養基(Lonza)及無蛋白質 CHO 培養基(西格瑪)。此等培養基中之每一種必要時可補充有各種化合物，諸如激素及/或其他生長因子(例如胰島素、運鐵蛋白、表皮生長因子、胰島素樣生長因子)、鹽(例如氯化鈉、磷酸鈣、磷酸鎂)、緩衝劑(例如 HEPES)、核苷(例如腺苷、胸苷)、麩醯胺酸、葡萄糖或其他等效營養物、抗生素及/或微量元素或市售進料，諸如 Power Feed A (Lonza)。若可複製的細胞為表現一種或多種可選擇標記物之重組細胞，則亦可將一種或多種合適的選擇劑(諸如抗生素)添加至培養基中。

【0312】 應瞭解，除含有對於所插入編碼序列(編碼多肽)之轉錄及轉譯所必需的元件以外，本文揭示之表現構築體亦可包含經工程化以使所表現多肽之穩定性、產生、純化、產率或活性最佳化的序列。

【0313】 在一些實施例中，經轉型細胞在允許表現較高量重組多肽之有效條件下培養。在一些實施例中，有效培養條件包含(但不限於)允許蛋白質產生之有效培養基、生物反應器、溫度、pH 及氧氣條件。熟習此項技術者將瞭解，術語「有效培養基」可涵蓋其中培養細胞以製造本文揭示之重組多肽的任何培養基。在一些實施例中，培養基通常包含具有可同化的碳、

氮及磷酸根來源以及適當鹽、礦物質、金屬及其他營養素(諸如維生素)之水溶液。在一些實施例中，本文揭示之細胞可在習知醱酵生物反應器、搖瓶、試管、微量滴定培養皿及培養皿中進行培養。在一些實施例中，培養在適於重組細胞之溫度、pH 及氧含量下進行。在一些實施例中，培養條件在本領域中普通技術人員之專門知識中。

【0314】 在一個實施例中，培養條件包括約 20-80%之溶氧(DO)含量。在另一實施例中，DO 含量為約 20-30%。在另一實施例中，DO 含量為約 30-40%。在另一實施例中，DO 含量為約 40-50%。在另一實施例中，DO 含量為約 50-60%。在另一實施例中，DO 含量為約 60-70%。在另一實施例中，DO 含量為約 70-80%。

【0315】 在一個實施例中，培養條件包括在一個溫度下開始且在製造期間偏移至另一者之 pH。在另一實施例中，pH 在約 7.3 下開始且在生物反應器培養期間偏移至約 6.7。在另一實施例中，pH 在約 7.3、約 7.2 或約 7.1 下開始且在生物反應器培養期間偏移至約 6.7、約 6.8、約 6.9 或約 7.0。

【0316】 在一些實施例中，取決於用於製造之載體及宿主系統，本文揭示之所得多肽留存在重組細胞中，或分泌至培養基中。

【0317】 在一個實施例中，在培養物中預定時間之後，進行重組多肽之回收。

【0318】 熟習此項技術者將瞭解，本文中所用之短語「回收重組多肽」可涵蓋收集含有多肽之整個培養基，且可隱含其他分離或純化步驟。

【0319】 在一個實施例中，本文揭示之多肽使用多種標準蛋白質純化技術純化，諸如(但不限於)親和性層析法、離子交換層析法、過濾、電泳、疏水性相互作用層析、凝膠過濾層析法、逆相層析法、刀豆球蛋白 A 層析法、羧基磷灰石層析法、層析聚焦及差異溶解。

【0320】 在一個實施例中，每一管柱可在受控制或不受控制的溫度下運作。

【0321】 於一實施例中，層析步驟均以下流模式進行。於另一實施例中，層析步驟均以上流模式進行。

【0322】 在一個實施例中，為了有助於回收，所表現之編碼序列可以經工程化以編碼本文揭示之多肽且融合至可裂解部分。在一個實施例中，融合蛋白可以被設計成使得多肽可容易地藉由親和性層析法分離；例如藉由固定於對可裂解部分具有特異性之管柱上來分離。在一個實施例中，裂解位點在多肽與可裂解部分之間經工程化，且多肽可藉由用特異性裂解此位點處之融合蛋白的適當酶或試劑處理而從層析管柱釋放[例如參見 Booth 等人,《免疫學通訊(Immunol.Lett.)》19:65-70(1988)；及 Gardella 等人,《生物化學期刊(J.Biol.Chem.)》265:15854-15859(1990)]。

【0323】 在一個實施例中，本文揭示之多肽以「實質純質」形式取回。熟習此項技術者將瞭解，短語「實質純質」可涵蓋允許在本文所述之應用中有效使用蛋白質之純度。此類形式亦可包含亦如本文揭示之高度醮基化（O 型醮鏈及/或 N 型醮鏈）及高度唾液酸化形式。於另一實施例中，此類形式亦可包含以高百分率羧化麩胺酸殘基、及/或低百分率氧化形式所形成之形式。又於一實施例中，本文中所揭露之 CTP 修飾的 FVII 多肽可包括一實質純質與活性形式之多肽。

【0324】 於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 20%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 15%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 10%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 8%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 5%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 4%被氧化。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之氧化比率係低於 3%被氧化。

【0325】 於一實施例中，氧化形式的減少與氧化形式程度的控制係於整個製造過程中進行，從上游到最終原料藥。

【0326】 於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 40%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 50%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 60%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 70%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 75%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 80%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 85%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 90%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 91%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 92%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 93%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 94%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 95%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 96%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 97%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 98%。於另一實施例中，所述實質純質及具活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽之純度係至少 99%。於又一實施例中，所述純度比例係選自由所 97.3%、97.6%、97.4%及 97.0%組成之群。

【0327】 在一個實施例中，本文所揭露的個體是人類個體。在另一個實施例中，所述個體是馴化的動物。在另一個實施例中，所述個體為寵物。在另一個實施例中，所述個體是哺乳動物。在另一個實施例中，所述個體

是家畜。在另一個實施例中，所述個體是猴。在另一個實施例中，所述個體是馬。在另一個實施例中，所述個體是母牛。在另一個實施例中，所述個體是小鼠。在另一個實施例中，所述個體是大鼠。在另一個實施例中，所述個體是犬科動物。在另一個實施例中，所述個體是貓科動物。在另一個實施例中，所述個體是牛、羊、豬、馬、鼠或鹿。在一個實施例中，所述個體是雄性。在另一個實施例中，所述個體是雌性。在一個實施例中，所述個體是兒童，在另一個實施例中為青少年，在另一個實施例中為成年人，或在另一個實施例中為老年個體。在另一個實施例中，所述個體是兒科個體，在另一個實施例中為老年病個體。

【0328】 在一個實施例中，本文揭示之多肽使用活體外表現系統合成。在一個實施例中，活體外合成方法在本領域中為熟知的並且系統之組分為市售的。

【0329】 在一個實施例中，使用重組 DNA 技術來生產由 CTP 修飾之因子 VIIa。

【0330】 在一些實施例中，重組多肽係經合成並純化；可在活體內或活體外分析其治療功效。在一個實施例中，由本文揭示之以 CTP 修飾的 VII/VIIa 之結合活性可使用各種分析確定。

【0331】 在一個實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VIIa 之方法包括以下步驟：自所述 WCB 獲得最佳表現所述 CTP 修飾的因子 VII 之殖株，且擴增所述殖株。在另一實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VIIa 之方法包括以下步驟：自所述 MCB 獲得最佳表現所述 CTP 修飾的因子 VII 之殖株，且擴增所述殖株。在另一實施例中，細胞殖株在溶液中經由一系列繼代步驟擴增至生產用生物反應器程度。在另一實施例中，將含有所述經繼代殖株之溶液接種於生物反應器中。在另一實施例中，生物反應器為拋棄式生物反應器。在另一實施例中，生物反應器包括不鏽鋼生物反應器、搖擺運動生物反應器(諸如來自 GE 之 Wave 系統)、灌注生物反應器或本領域中已知的任何其他

生物反應器系統。在一個實施例中，自生物反應器移除細胞藉由使用拋棄式過濾器系統來實現。若進行大規模製造，則可在使用過濾系統之前使用連續離心。

【0332】 在一個實施例中，細胞殖株藉由在大小逐漸增加之生物反應器中連續培養所述細胞來進一步擴增或規模放大，直至達到所期望的規模。在另一實施例中，生物反應器以分批進料模式運作。在另一實施例中，生物反應器以批次饋料模式運作。在另一實施例中，生物反應器以重複分批模式運作。在另一實施例中，生物反應器以灌注模式運作。上文所述之各可能性為另一實施例。

【0333】 視所使用之生物反應器類型而定，峰值活細胞密度不同。在一個實施例中，本文揭示之製造方法中使用的生物反應器之峰值活細胞密度為約 $0.2 \times 10^6 - 1.4 \times 10^6$ 個細胞/毫升。在另一實施例中，本文揭示之製造方法中使用之生物反應器的峰值活細胞密度為約 $0.05 \times 10^6 - 100 \times 10^6$ 。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約 $0.05 \times 10^6 - 0.5 \times 10^6$ 。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約 $0.5 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ 。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約 $5.0 \times 10^6 - 50 \times 10^6$ 。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約 $50 \times 10^6 - 100 \times 10^6$ 。

【0334】 生物反應器使用之進料流程可不同，例如自某一天起重複每天進料，或在數天內不變，此外所添加之進料%可不同，自很小%至甚至 50% 或更大。

【0335】 DMSO 可以如本領域中已知的不同濃度添加至生物反應器中。在一個實施例中，將 0.1-3% DMSO 在生物反應器使用期間添加至生物反應器中。在另一實施例中，添加 0.1-0.5% DMSO。在另一實施例中，添加 0.5-1.0% DMSO。在另一實施例中，添加 1.0-1.5% DMSO。在另一實施例中，添加 1.5-2.0% DMSO。在另一實施例中，添加 2.0-2.5% DMSO。在另一實施例中，添加 2.5-3.0% DMSO。

【0336】 在一個實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VIIa 之方法包括純化及活化澄清的採集溶液以便獲得經純化的活性 CTP 修飾的 FVII 溶液之步驟。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少 5-95%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少 5%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化蛋白質溶液係包括至少 10%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化蛋白質溶液係包括至少 20%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，使用所呈現之方法製造的經純化蛋白質溶液。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化蛋白質溶液包括至少 30%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa，包括至少 40%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少 50%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少 60%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少 70%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少 80%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少 90%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少 95%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。

【0337】 在一個實施例中，澄清的採集液在 2-25°C 下保持至 24 小時。在另一實施例中，澄清的採集液在至少 5°C 下儲存至一個月。

【0338】 在一個實施例中，測試在步驟中所獲得之澄清採集液之生物負荷、細菌內毒素、特定蛋白質含量、殘餘 DNA、病毒、病毒樣粒子及/或黴漿菌或其任何組合。

【0339】 在一個實施例中，澄清採集液之純化係藉由依序進行包括以下各項之步驟來實現：(g)濃縮、滲濾並純化所述澄清的採集溶液，其中所述

濃縮、滲濾及純化藉由中空纖維卡匣或切向流卡匣使所述澄清的採集溶液依序通過陰離子交換管柱及疏水性相互作用管柱來實現；(h)獲得在步驟之後獲得之所述澄清採集液；(i)以及藉由在對病毒有毒性之溶液中培養而使所述澄清的採集液中存在之所述病毒去活化；(j)獲得來自(h)之所述澄清的採集溶液，且濃縮、滲濾、活化並純化所述澄清的採集溶液，其中所述濃縮、滲濾、活化以及純化之後為使所述澄清的採集溶液依序通過親和性管柱、複合模式或混合模式管柱、疏水性作用管柱(HIC)及陰離子交換管柱；(j)在步驟(i)之後獲得所述澄清採集溶液，並藉由奈米過濾以物理方式自病毒移除所述澄清的採集溶液；(k)在步驟(j)之後獲得所述澄清採集溶液，且濃縮、滲濾並純化所述澄清採集溶液，以獲得含有所述高度醮基化形式之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之經最大限度純化的澄清採集液。

【0340】 於一實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係於純化期間被活化。於一替代實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII 係於純化之後被活化。所述 CTP 修飾的 FVII 係與任何純化步驟同時進行活化。

【0341】 於一實施例中，超微過濾及滲濾至濃縮及過濾澄清的採集液係可使用中空纖維濾筒、或等效之基於 TFF 的 UFDF 步驟進行。該濾筒標稱分子量截斷大小為 10,000 kDa。於另一實施例中，膜濾筒可遵照截斷 3 kDa 至 30 kDa 之 PES/PS/RC 膜。於另一實施例中，該 UFDF 步驟可在層析步驟之間執行。於另一實施例中，該 UFDF 步驟可在使用陰離子交換管柱之前執行。於另一實施例中，該 UFDF 步驟可在使用疏水性相互作用層析(HIC)之前執行。於另一實施例中，該 UFDF 步驟可在使用疏水性相互作用層析(HIC)之後執行。又在另一實施例中，於另一實施例中，該 UFDF 步驟可在多個步驟中執行，例如 UFDF 可在採集之後、在層析步驟之間執行，或做為一個在以奈米過濾移除病毒之後的步驟，或其組合。

【0342】 在另一實施例中，陰離子交換管柱為 DEAE-瓊脂糖快速流動管柱。在另一實施例中，DEAE 管柱純化所述高度醮基化形式之 CTP 修飾的

因子 VII/VIIa。在一個實施例中，醣基化愈高，所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之藥效動力學愈好。在另一實施例中，陰離子交換管柱可包括本領域中已知的其他陰離子交換管柱，例如 Capto DEAE 陰離子交換管柱或其他樹脂，諸如 Eshmuno Q。

【0343】 在一個實施例中，該疏水性管柱為苯基疏水性相互作用層析 (HIC) 管柱。苯基 HIC 之使用循環次數可在介於約 1-10 次之間的範圍內。在一個實施例中，進行 1-3 個循環。在另一實施例中，進行 1-5 個循環。在另一實施例中，進行 1-6 個循環。在另一實施例中，進行 1-7 個循環。在另一實施例中，進行 1-8 個循環。在另一實施例中，進行 1-9 個循環。在另一實施例中，進行 1-10 個循環。在另一實施例中，本領域中已知的緩衝液用於洗滌及溶析。在一個實施例中，溶析緩衝液包括硫酸銨與丙二醇。在一個實施例中，溶析緩衝液包括硫酸銨與乙二醇。

【0344】 在一個實施例中，羥基磷灰石混合模式管柱包括陶瓷羥基磷灰石混合模式管柱 (CHT)。CHT 之使用循環次數可在介於約 1-10 之間的範圍內。在一個實施例中，進行 1-3 個循環。在另一實施例中，進行 1-5 個循環。在另一實施例中，進行 1-6 個循環。在另一實施例中，進行 1-7 個循環。在另一實施例中，進行 1-8 個循環。在另一實施例中，進行 1-9 個循環。在另一實施例中，進行 1-10 個循環。自 CHT 管柱溶析可用在約 3-10 之間的管柱體積 (CV) 進行。在一個實施例中，溶析用約 3 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 4 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 5 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 6 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 7 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 8 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 9 個 CV 進行。在另一實施例中，溶析用約 10 個 CV 進行。

【0345】 在一個實施例中，使由於污染而可能存在於澄清的採集液中之病毒在澄清的採集液中去活化。在另一實施例中，病毒使用 1% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 0.2 至 2% Triton-X 100 溶液去

活化。在另一實施例中，病毒使用 0.5% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 1-4% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 0.2-0.5% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 0.5-1.0% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 2% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 3% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 4% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，病毒使用 5-10% Triton-X 100 溶液去活化。在另一實施例中，在 Triton-X 100 溶液中之病毒去活化持續約 0.5 至 24 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 0.5 至 1 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 1 至 2 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 2 至 3 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 3 至 4 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 4 至 6 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 6 至 8 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 8 至 10 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 10 至 12 小時。在另一實施例中，在 Triton-X 溶液中之病毒去活化持續約 12 至 24 小時。

【0346】 本領域中熟習此項技術者應瞭解，本領域中可供使用且對此等病毒有毒性之其他濃度或其他溶液(包含(但不限於)膽酸鈉及 Tween 80)可用於本文揭示之方法。在另一實施例中，磷酸三正丁酯(TNBP)與聚山梨醇酯 80 (Tween 80)之混合物用於在步驟(h)中使病毒去活化。

【0347】 在一個實施例中，病毒藉由使用奈米過濾以物理方式移除。本領域中熟習此項技術者應瞭解，本領域中已知用於移除病毒之任何過濾器可在本文揭示之方法中施用。在另一實施例中，奈米過濾使用 Planova 或 Planova 型過濾器濾筒(1-60 mm²)進行。所述方法之後為使用本領域中已知的方法證實病毒自澄清的採集液清除。

【0348】 在一個實施例中，本文所揭示之方法實現經高度醣基化之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之至少 20%回收率。在另一實施例中，所述方法實現經高度醣基化之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之至少 5%回收率、至少 10%、至少 15%、20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.9%回收率。

【0349】 在一個實施例中，在純化經高度醣基化之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之後，本文所揭示之方法進一步包括表徵所述 CTP 修飾的多肽。在另一實施例中，測定所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之純度。在另一實施例中，測定醣基化含量。在另一實施例中，測定醣基化位點佔有率。在一個實施例中，測定所製造之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 中之純度、醣基化含量以及醣基化位點佔有率。

【0350】 在另一實施例中，將用於本文揭示之方法中的細胞植株儲存在冷凍細胞庫中。在另一實施例中，將細胞植株儲存在凍乾細胞庫中。

【0351】 在另一實施例中，本文揭示之方法及組合物之細胞庫為主細胞庫。在另一實施例中，細胞庫為工作細胞庫。在另一實施例中，細胞庫為良好作業規範(GMP)細胞庫。在另一實施例中，細胞庫旨在用於製造臨床級材料。在另一實施例中，細胞庫符合監管規範以便人類使用。在另一實施例中，細胞庫為本領域中已知的任何其他類型之細胞庫。

【0352】 在另一實施例中，「良好作業規範」由美國聯邦法規法典(the United States Code of Federal Regulations)之(21 CFR 210-211)定義。在另一實施例中，「良好作業規範」由用於製造臨床級材料或用於人類消費之其他標準定義；例如除美國以外的國家之標準。各可能性代表本文所揭示之一各別實施例。

【0353】 在另一實施例中，用於繁殖細胞之培養基係含有甲胺喋呤(MXT)。在另一實施例中，培養基為無甲胺喋呤之培養基。在另一實施例中，

存在於培養基中之 MXT 的濃度在約 0.1-2 μM 之間。在另一實施例中，存在於培養基中之 MXT 的濃度為約 0.1-0.5 μM 。在另一實施例中，存在於培養基中之 MXT 的濃度為約 0.5-1.0 μM 。在另一實施例中，存在於培養基中之 MXT 的濃度為約 1.0-1.5 μM 。在另一實施例中，存在於培養基中之 MXT 的濃度為約 1.5-2.0 μM 。將充分瞭解到，術語「培養基」可涵蓋適用於包括有本文所揭露 CTP 修飾的因子 VII 之細胞的生長或培養的液體或凝膠或粉末。此類培養基可替代地稱為「生長培養基」或「培養基」，且可包含(但不限於)營養培養基、滋補培養基、基本培養基、鑑別培養基、運送培養基或選擇培養基。在另一態樣中，選擇培養基可適用於在製造製程期間選擇特定細胞組。

【0354】 在一個實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 5-95%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 5% 之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 10%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 15%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 20%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 30%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 40%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 50%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 60%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 70%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少 80%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的溶液含有至少 90-95%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的溶液含有 95.1-99.9%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。在另一實施例中，經純化的溶液含有 100%之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa。

【0355】 於一實施例中，所製造之 CTP 修飾的凝血因子係包括高%的 γ 羧化。熟習此項技術者將瞭解，凝血因子的 γ 羧化比率(%)係可與 CTP 修飾的凝血因子之效價有直接關係。於一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 50%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 60%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 70%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 80%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 90%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 92%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 93%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 94%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 95%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 96%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 97%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 98%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 99%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括至少 100%的 γ 羧化。

【0356】 於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 45-50%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 50-60%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 60-70%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 70-80%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 80-85%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%

係包括介於 85-90%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 90-92%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 90-95%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 95-97%的 γ 羧化。於另一實施例中，FVII-CTP₃ 或 FVIIa-CTP₃ 的 γ 羧化比率%係包括介於 95-100%的 γ 羧化。

【0357】 於一實施例中，低 γ 羧化的移除係於本文中所揭露之製造流程的複合或混合模式層析步驟中（參步驟 9，圖 17）執行。

【0358】 在一個實施例中，所製造之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 經高度醣基化。熟習此項技術者將充分瞭解到，術語「經高度醣基化」當關於 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 時可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 70-80%之醣基化程度。在另一實施例中，經高度醣基化的 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 具有至少 70%之醣基化程度。在另一實施例中，經高度醣基化的 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 具有至少 80%之醣基化程度。在另一實施例中，術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 81-90%之醣基化程度。在另一實施例中，經高度醣基化的 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 具有至少 90%之醣基化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VIIa 多肽之約 91-95%之醣基化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 95.1-99%之醣基化程度。在另一實施例中，術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 100%之醣基化程度。經高度醣基化的 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽可在針對長效因子 VII/VIIa 使用之方法中具有有益特性，支援投予頻率降低。與重組因子 VII/VIIa 相比，較高醣基化程度有助於 CTP 修飾的因子 VII/VIIa（例如 CTP 修飾的因子 VIIa）顯著增加的水動力體積。此可引起 CTP 修飾的因子 VIIa 之循環時間延長。

【0359】 在一個實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 4-6 個。在

另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目在 4-6 之間。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 4-8 個。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目在 4-8 個之間。在一個實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 6-8。在一個實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目在 6-8 個之間。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 4 個。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 5 個。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 6 個。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為至少 7 個。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目為 8 個。

【0360】 在一個實施例中，每個連接有一個 CTP 之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 4-6 個。在另一實施例中，每個連接有一個 CTP 之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 6-8 個。在另一實施例中，每個連接有一個 CTP 之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 4-8 個。在另一實施例中，每個連接有兩個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 8-12 個。在另一實施例中，每個連接有兩個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 12-16 個。在另一實施例中，每個連接有兩個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 8-16 個。在另一實施例中，每個連接有三個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 12-18 個。在另一實施例中，每個連接有三個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 18-24 個。在另一實施例中，每個連接有三個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 12-24 個。在另一實施例中，每個連接有四個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 16-24 個。在另一實施例中，每個連接有四個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 24-32 個。在另一實施例中，每個連接有四個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 16-32 個。在另一實施

例中，每個連接有五個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 20-30 個。在另一實施例中，每個連接有五個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 30-40 個。在另一實施例中，每個連接有五個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 20-40 個。在另一實施例中，每個連接有六個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 24-36 個。在另一實施例中，每個連接有六個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 36-48 個。在另一實施例中，每個連接有六個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 24-48 個。在另一實施例中，每個連接有七個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 28-35 個。在另一實施例中，每個連接有七個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 42-56 個。在另一實施例中，每個連接有七個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 28-56 個。在另一實施例中，每個連接有八個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 32-48 個。在另一實施例中，每個連接有八個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 48-64 個。在另一實施例中，每個連接有八個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 32-64 個。在另一實施例中，每個連接有九個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 36-54 個。在另一實施例中，每個連接有九個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 54-72 個。在另一實施例中，每個連接有九個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 36-72 個。在另一實施例中，每個連接有十個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 40-60 個。在另一實施例中，每個連接有十個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 60-80 個。在另一實施例中，每個連接有五個 CTP 單元之 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 O 型醣鏈數目為至少 40-80 個。

【0361】 在一個實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈佔有率為至少 70%。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈佔有率為至少 80%。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈佔有率為至少 90%。在另一實施例中，每個 CTP 之 O 型醣鏈佔有率為 100%。

【0362】 於一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之高比例 N 型醣鏈為帶電荷的。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 40%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 50%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 60%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 70%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 80%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 85%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 90%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括至少 95%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括 100%。

【0363】 於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 40%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 50%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 60%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 70%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 80%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 85%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 90%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的

FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 95%。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 100%。

【0364】 於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 10%與 30%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 20%與 40%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 30%與 40%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 20%與 50%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 40%與 50%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 30%與 60%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 50%與 60%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 40%與 70%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 60%與 70%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 50%與 80%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 70%與 80%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 55%與 85%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 80%與 85%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 60%與 90%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 85%與 90%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 65%與 95%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係包括約 90%與 95%之間。於另一實施例中，每個 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之帶電荷的 N 型醣鏈比例係

包括約 95%與 100%之間。

【0365】 於一實施例中，所述高程度之帶電荷的 N 型醣鏈係由本文中所揭露之製造過程中的上游製程所驅動。於另一實施例中，超過 60%之帶電荷的 N 型醣鏈係於早期 DSP 階段達到，且此程度係經維持直至獲得最終的原料藥。

【0366】 於一實施例中，所述高程度之帶電荷的 N 型醣鏈係由本文中所揭露之製造過程中的上游製程所驅動。於另一實施例中，超過 60%之帶電荷的 N 型醣鏈係於早期 DSP 階段達到，且此程度係經維持直至獲得最終的原料藥。

【0367】 在一個實施例中，CTP 修飾的因子 VII/VIIa 係經高度唾液酸化。本領域中熟習此項技術者應瞭解，術語「高度唾液酸化」當關於 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 時可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VIIa 多肽之約 70-80%之唾液酸化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 80-90%之唾液酸化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 90-95%之唾液酸化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之約 95.1-99%之唾液酸化程度。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽之 100%之唾液酸化程度。在另一實施例中，CTP 修飾的因子 VIIa 中之 O 型醣鏈結構包括單唾液酸化之核心 1。

【0368】 於一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之高比例唾液酸化及 O 型醣鏈係增加了 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之效價。於另一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之高比例唾液酸化及 O 型醣鏈係增加了 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 之流體動力體積。

【0369】 於一實施例中，本文所述之 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 係具有效價。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII/FVIIa 係實質純質且具有活性之 CTP 修飾的 FVII 多肽。於另一實施例中，所述 CTP 修飾的 FVII/FVIIa

係使用本文中所描述之方法所製造。於另一實施例中，所述效價為至少 5,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 7,500 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 10,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 10,500 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 15,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 20,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 25,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 27,500 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 30,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 3,500 U/mg。於另一實施例中，所述效價為至少 40,000 U/mg。於另一實施例中，所述效價係選自由 15,563 U/mg、16,720 U/mg、22,478 U/mg 及 23,608 U/mg 所組成之群。

【0370】 在一個實施例中，CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽係由連接至所述因子 VII/VIIa 之羧基末端的兩個 CTP 及連接至所述因子 VII/VIIa 之胺基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在另一實施例中，CTP 修飾的因子 VII/VIIa 多肽係由連接至所述因子 VII/VIIa 之羧基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。

【0371】 在一個實施例中，包括有一編碼所述 CTP 修飾的因子 VII/VIIa 之編碼部分的表現載體亦包括啟動子、所述 CTP 修飾的多肽之編碼序列及聚腺苷酸化序列。在一個實施例中，聚腺苷酸化序列為猴病毒(SV)40 聚腺苷酸化序列。

【0372】 在一個實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以介於 30-1500 mg/L 之間的量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 30 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 40 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 50 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 60 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 70 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少

50-70 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 80 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 90 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 70-100 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 100 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 200 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 100-200 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 300 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 200-300 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 400 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 300-400 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 500 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 500-600 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 600 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 600-700 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 700 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 701-800 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 800 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 801-900 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 900 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 901-1000 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1000 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1001-1100 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1100 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1101-1200 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1200 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1201-1300

mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1300 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1301-1400 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1400 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1401-1500 mg/L 之量表現。在另一實施例中，所述 CTP 修飾的因子 VII 係以至少 1500 mg/L 之量表現。

【0373】 本領域中熟習此項技術者應瞭解，術語「表現」可涵蓋異源核酸序列在宿主細胞中之轉錄及/或轉譯。所期望的相關產物/蛋白質在宿主細胞中之表現量可基於以下測定：細胞中存在之相應 mRNA 或 cDNA 之量，或由如本發明實例中之所選序列編碼的所期望的相關多肽/蛋白質之量。舉例而言，自所選序列轉錄之 mRNA 可藉由北方墨點雜交、核糖核酸酶 RNA 保護、原位雜交至細胞 RNA 中或藉由 PCR 來定量(參見 Sambrook 等人,1989；Ausubel 等人,1987 更新)。由所選序列編碼之蛋白質可利用各種方法定量，例如 ELISA、西方墨點法、放射免疫分析、免疫沈澱、對蛋白質生物活性之分析、對蛋白質進行免疫染色之後進行 FACS 分析(參見 Sambrook 等人, 1989；Ausubel 等人, 1987 更新)或均質時差式螢光(HTRF)分析。在一個實施例中，CTP 修飾的因子 VII 之定量包括使用逆相高效液相層析(RP-HPLC)。在另一實施例中，RP-HPLC 包括 C-18 管柱。在另一實施例中，RP-HPLC 包括 C-8 管柱。在另一實施例中，本文揭示之方法使用 RP-HPLC 以定量採集液中之 CTP 修飾的因子 VII(參見實例 3 步驟 2 至 5)。在另一實施例中，本文揭示之方法使用 RP-HPLC 以於純化期間定量 CTP 修飾的因子 VII。

【0374】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫或冷凍儲備液在解凍後展現大於 90%之存活率。在另一實施例中，儲存持續不定量的時間。

【0375】 在另一實施例中，儲存持續 2 週。在另一實施例中，儲存持續 3 週。在另一實施例中，儲存持續 1 個月。在另一實施例中，儲存持續 2 個月。

在另一實施例中，儲存持續 3 個月。在另一實施例中，儲存持續 5 個月。在另一實施例中，儲存持續 6 個月。在另一實施例中，儲存持續 9 個月。在另一實施例中，儲存持續 1 年。

【0376】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫或冷凍儲備液利用包括以下之方法冷凍保存：使細胞之培養物在本文揭示之成分確定的培養基中生長，將培養物冷凍在包括甘油之溶液中，且將細胞植株儲存在 -20°C 以下。在另一實施例中，溫度為約 -70°C 。在另一實施例中，溫度為約 -70 至 -80°C 。在另一實施例中，本文揭示之任何成分確定的培養基可用於此方法。各成分確定的培養基表示本文揭示之一各別實施例。

【0377】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物接種自細胞庫。在另一實施例中，培養物接種自冷凍儲備液。在另一實施例中，培養物接種自起子培養物。在另一實施例中，培養物接種自群落。在另一實施例中，培養物在生長對數中期下接種。在另一實施例中，培養物在大致生長對數中期下接種。在另一實施例中，培養物在另一生長期下接種。

【0378】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，用於冷凍之溶液包括呈 2-20%量之 DMSO。在另一實施例中，量為 2%。在另一實施例中，量為 20%。在另一實施例中，量為 1%。在另一實施例中，量為 1.5%。在另一實施例中，量為 3%。在另一實施例中，量為 4%。在另一實施例中，量為 5%。在另一實施例中，量為 2%。在另一實施例中，量為 2%。在另一實施例中，量為 7%。在另一實施例中，量為 7.5%。在另一實施例中，量為 9%。在另一實施例中，量為 10%。在另一實施例中，量為 12%。在另一實施例中，量為 14%。在另一實施例中，量為 16%。在另一實施例中，量為 18%。在另一實施例中，量為 22%。在另一實施例中，量為 25%。在另一實施例中，量為 30%。在另一實施例中，量為 35%。在另一實施例中，量為 40%。

【0379】 在另一實施例中，添加劑為蔗糖。在另一實施例中，添加劑為

本領域中已知的任何其他濃度相關的添加劑或具有抗冷凍特性之添加劑。各可能性代表本文所揭示之一各別實施例。

【0380】 在一個實施例中，本文揭示之方法及組合物中所使用之冷凍溶液包括改良性培養基及 DMSO。在一個實施例中，本文揭示之方法及組合物中所使用之冷凍溶液包括約 46.255%改良性培養基及 7.5% DMSO。

【0381】 在一個實施例中，細胞培養利用本領域中常規之技術生長。在另一實施例中，在細胞培養物生長期間維持恆定 pH。在另一實施例中，pH 維持在約 7.0 下。在另一實施例中，pH 為約 6。在另一實施例中，pH 為約 6.5。在另一實施例中，pH 為約 7.5。在另一實施例中，pH 為約 8。在另一實施例中，pH 為 6.5-7.5。在另一實施例中，pH 為 6-8。在另一實施例中，pH 為 6-7。在另一實施例中，pH 為 7-8。

【0382】 在另一實施例中，在培養物生長期間維持恆定溫度。在另一實施例中，溫度維持在約 37°C 下。在另一實施例中，溫度為 37°C。在另一實施例中，溫度為 25°C。在另一實施例中，溫度為 27°C。在另一實施例中，溫度為 28°C。在另一實施例中，溫度為 30°C。在另一實施例中，溫度為 32°C。在另一實施例中，溫度為 34°C。在另一實施例中，溫度為 35°C。在另一實施例中，溫度為 36°C。在另一實施例中，溫度為 38°C。在另一實施例中，溫度為 39°C。

【0383】 在另一實施例中，在培養物生長期間維持恆定溶解氧濃度。在另一實施例中，溶解氧濃度維持在 20%飽和下。在另一實施例中，濃度為 15%飽和。在另一實施例中，濃度為 16%飽和。在另一實施例中，濃度為 18%飽和。在另一實施例中，濃度為 22%飽和。在另一實施例中，濃度為 25%飽和。在另一實施例中，濃度為 30%飽和。在另一實施例中，濃度為 35%飽和。在另一實施例中，濃度為 40%飽和。在另一實施例中，濃度為 45%飽和。在另一實施例中，濃度為 50%飽和。在另一實施例中，濃度為

55%飽和。在另一實施例中，濃度為 60%飽和。在另一實施例中，濃度為 65%飽和。在另一實施例中，濃度為 70%飽和。在另一實施例中，濃度為 75%飽和。在另一實施例中，濃度為 80%飽和。在另一實施例中，濃度為 85%飽和。在另一實施例中，濃度為 90%飽和。在另一實施例中，濃度為 95%飽和。在另一實施例中，濃度為 100%飽和。在另一實施例中，濃度為接近 100%飽和。

【0384】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物在每器皿最大體積 2 公升之培養基中生長。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 200 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 300 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 500 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 750 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 1 L。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 1.5 L。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿 2.5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿 3 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿 5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿至少 5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿至少 10 L。

【0385】 在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 2 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 500 ml。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 750 ml。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 1 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 1.5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 2.5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 3L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 4 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 6 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 8L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿 10 L。

【0386】 在另一實施例中，當培養物之密度為 1×10^6 個活細胞(VC)/ml 時，

進行冷凍步驟。在另一實施例中，生物質為 1.5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 1.5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 2×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 3×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 4×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 7×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 9×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 10×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 12×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 15×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 20×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 25×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 30×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 33×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 40×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為 50×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質大於 50×10^6 VC/ml。

【0387】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，將細胞培養物急驟冷凍在液態氮中，之後儲存在最終冷凍溫度下。在另一實施例中，培養物以更漸進方式冷凍；例如藉由置放在最終儲存溫度之培養物小瓶中。在另一實施例中，培養物藉由本領域中已知的用於冷凍細胞培養物之任何其他方法冷凍。

【0388】 熟習此項技術者應理解，術語「細胞培養」及「組織培養」可互換使用，且表示將細胞在活體外維持在液體培養基中之懸浮培養物中或具備液體培養基之諸如玻璃、塑膠或瓊脂的表面上。通常，「細胞培養」使經緩衝以維持恆定合適的 pH 之培養基成為必要。細胞培養中使用之培養基通常被調配成包含充足供應之必需營養物，且可針對所維持之特定細胞在滲透上進行調整，且溫度及氣相亦控制在合適的界限值中。細胞培養技術為本領域中眾所周知的。參見例如 Morgan 等人 1993《動物細胞培養》，BIOS Scientific Publishers, 英國牛津 (Oxford, UK)；及 Adams, R.L.P. 1990《生物化學家的細胞培養(Cell Culture for Biochemists)》，第二版, Elsevier。

【0389】 本領域中熟習此項技術者應瞭解，術語「繼代」可涵蓋繼代培養細胞群體之操作。熟習此項技術者將瞭解，術語「繼代培養物」可涵蓋藉由接種無菌培養基建立之細胞培養物，其在一個實施例中為新鮮無菌培養基，具有來自先前培養物之樣本。

【0390】 熟習此項技術者亦應瞭解，術語「細胞株系」可涵蓋使用繼代技術衍生自原代培養物之細胞群體。由此，原代培養物可繼代培養至兩個或更多個新的培養物中，且繼代培養以週期性時間間隔重複持續數個月以維持所述細胞株系。繼代培養可使用已確立的細胞培養技術進行。

【0391】 在一個實施例中，繼代的細胞株系及永生化的細胞株之特徵可為其表現特定功能標記物，諸如角蛋白、激素以生長因子受體等。

【0392】 在一些態樣中，培養可在添加生長因子之無血清的成分確定的培養基中進行。在其他態樣中，培養基含有添加或不添加生長因子之血清。此類修改可由熟習此項技術者憑經驗確定以便使細胞增殖最佳化。

【0393】 熟習此項技術者應瞭解，術語「細胞株」可涵蓋來源於單個外植體之細胞群體，所述外植體特徵為具有在活體外無限增殖的可能性。細胞株可基於其在培養物中存活且繼續生長之能力自原代培養物分離。最初來源於腫瘤組織之細胞株可能已在活體內經轉型，不過並非所有贅生性細胞群體均具有在活體外無限生長之能力。另外，細胞株通常經過多輪分裂保持其分化特徵。

【0394】 合適的細胞培養基板通常為可經滅菌、不瀝出毒性因子且不扭曲顯微鏡影像之容器。由此，由玻璃及塑膠形成之培養盤在本文中為合適的基板。塑膠容器可使用本領域中已知的技術進一步處理以促進細胞附著(Ramsey 等人 1984《活體外(In vitro)》20：802)。合適的組織培養基通常由等滲、緩衝、基礎的營養培養基組成，其與無機鹽、胺基酸、維生素及各種補充劑一起提供能量來源。補充劑可包含血清(例如胎牛血清等)各種抗生素以防止污染或提供選擇條件、附著及生長因子等。許多培養基調配物

為本領域中已知的，諸如(但不限於)基本必需培養基(MEM)、羅斯威爾派克紀念研究所(Rosewell Park Memorial Institute, RPMI)1640 或杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)。合適的組織培養條件亦為本領域中已知的。參見例如 Morgan 等人 1993 《動物細胞培養》, BIOS Scientific Publishers Ltd., 英國牛津(Oxford, UK); 及 Adams, R. L. P. 1990 《生物化學家的細胞培養》, 第二版, Elsevier。在本文揭示之另一實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VII 之方法為無血清方法。在本文揭示之另一實施例中，製造 CTP 修飾的因子 VII 之方法為無動物衍生物方法。

【0395】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物之儲存溫度在-20 與-80 攝氏度(°C)之間。在另一實施例中，溫度顯著低於-20°C。在另一實施例中，溫度不暖於-70°C。在另一實施例中，溫度為-70°C。在另一實施例中，溫度為約-70°C。在另一實施例中，溫度為-20°C。在另一實施例中，溫度為約-20°C。在另一實施例中，溫度為-30°C。在另一實施例中，溫度為-40°C。在另一實施例中，溫度為-50°C。在另一實施例中，溫度為-60°C。在另一實施例中，溫度為-80°C。在另一實施例中，溫度為-30°C至-70°C。在另一實施例中，溫度為-40°C至-70°C。在另一實施例中，溫度為-50°C至-70°C。在另一實施例中，溫度為-60°C至-70°C。在另一實施例中，溫度為-30°C至-80°C。在另一實施例中，溫度為-40°C至-80°C。在另一實施例中，溫度為-50°C至-80°C。在另一實施例中，溫度為-60°C至-80°C。在另一實施例中，溫度為-70°C至-80°C。在另一實施例中，溫度冷於-70°C。在另一實施例中，溫度冷於-80°C。

【0396】 在另一實施例中，為了低溫保存，將細胞緩慢冷凍直至其在包含低溫保護劑之培養基中達至低於-70°C之溫度，且接著將小瓶轉移至液態氮冷凍機以使其維持在低於-130°C之溫度下。

【0397】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最長 24 小時。在另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最長 2

天，持續最長 3 天，持續最長 4 天，持續最長 1 週，持續最長 2 週，持續最長 3 週，持續最長 1 個月，持續最長 2 個月，持續最長 3 個月，持續最長 5 個月，持續最長 6 個月，持續最長 9 個月或持續最長 1 年。上列每個可能性為本文揭示之一實施例。

【0398】 在另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最短 1 週，持續最短 2 週，持續最短 3 週，持續最短 1 個月，持續最短 2 個月，持續最短 3 個月，持續最短 5 個月，持續最短 6 個月，持續最短 9 個月，持續最短 1 年，持續最短 1.5 年，持續最短 2 年，持續最短 3 年，持續最短 5 年，持續最短 7 年，持續最短 10 年，或持續長於 10 年。上列每個可能性為本文揭示之一實施例。

【0399】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，細胞在延長時段之低溫保存或冷凍儲存後解凍之後展現出生長。在另一實施例中，細胞在用來自細胞庫或起子培養物之細胞接種新鮮培養基之後的約 15-22 小時內展現出生長。在另一實施例中，細胞在用來自細胞庫或起子培養物之細胞接種新鮮培養基之後的約 12-20 小時內展現出生長。在一個實施例中，為了確保存活率、基因穩定性以及表型穩定性，細胞株需要維持在指數生長期(經由定期繼代培養)。

【0400】 在另一實施例中，「延長時段」之低溫保存或冷凍儲存為 1 個月。在另一實施例中，所述時段為 2 個月。在另一實施例中，所述時段為 3 個月。在另一實施例中，所述時段為 5 個月。在另一實施例中，所述時段為 6 個月。在另一實施例中，所述時段為 9 個月。在另一實施例中，所述時段為 1 年。在另一實施例中，所述時段為 1.5 年。在另一實施例中，所述時段為 2 年。在另一實施例中，所述時段為 2-7 年。在另一實施例中，所述時段持續至少 7 年。在另一實施例中，所述時段持續至少 10 年。

【0401】 在另一實施例中，本文揭示之方法及組合物之細胞在低溫保存後解凍之後保持超過 90%之存活率。在另一實施例中，在低溫保存時段之

後，在解凍後的存活率接近 100%。在另一實施例中，在解凍後的存活率接近 90%。在另一實施例中，在解凍後的存活率為至少 90%。在另一實施例中，在解凍後的存活率超過 80%。

【0402】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫、冷凍儲備液或疫苗劑量批料生長在成分確定之細胞培養基中。所述培養基為本領域中已知的且可包含(但不限於)杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)(ATCC®第 30-2002 號)、伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基(IMDM)(ATCC®第 30-2005 號)、Hybri-Care 培養基(ATCC®第 46-X 號)、麥考伊氏(McCoy's)5A 及 RPMI-1640 (ATCC®第 30-2007 號)、哈姆氏營養混合物(ATCC® CCL-61™)、化學成分確定之 PowerCHO™、無血清 CHO 培養基(Lonza 目錄號 12-771Q)；或本領域中已知的任何其他培養基。在另一實施例中，此等培養基可補充抗生素或動物血清，如將由熟習此項技術者憑經驗確定。

【0403】 在一個實施例中，本文揭示生物反應器及方法，其允許以大規模體積培養哺乳動物細胞。此外以及在另一實施例中，即使以大規模體積生長，所述生物反應器及方法亦允許在最佳條件下培養哺乳動物細胞，且因此允許與生物反應器之大小無關的製程效能及產物品質。在生物反應器中之培養持續時間可僅藉由改變規模及生物反應器系統來改變，例如持續時間可在 8-9 天之間，或其可在 15-16 天之間。在另一實施例中，在生物反應器中之培養持續時間為約 7 天、約 8 天、約 9 天、約 10 天、約 11 天、約 12 天、約 13 天、約 14 天、約 15 天、約 16 天、約 17 天、約 18 天、約 19 天、約 20 天或更長。在另一實施例中，當使用灌注生物反應器時，培養持續時間可高達 7-120 天。

【0404】 在另一實施例中，本文揭示大規模生物反應器，其允許在均質環境中相對於諸如 pH、溶解氧張力(DOT)及溫度之製程參數培養哺乳動物細胞，在生物反應器中維持充分混合的細胞懸浮液且摻合營養物進料。在另一實施例中，生物反應器為拋棄式生物反應器。

【0405】 本文揭示之方法藉由根據申請專利範圍提供生物反應器、生物反應器系統及用於培養真核細胞(尤其哺乳動物細胞)之方法來解決構成本文揭示之方法的基礎的技術問題。

【0406】 在一個實施例中，生物反應器之體積為至少 250 公升(L)。在另一實施例中，生物反應器之體積為至少 500L。在另一實施例中，體積為至少 1000 L、至少 2000 L、至少 5,000 L、至少 10,000 L、至少 12,000 L 或至少 15,000 L。

【0407】 在另一實施例中，細胞在遞增體積之生物反應器中繼代(參見實例)。

【0408】 如本領域中通常已知的，本發明之經修飾的肽及蛋白質係可偶合至標記、藥物、靶向劑、載劑、固體支撐物及其類似物，視所期望的應用而定。經修飾生物製品之標記形式可以用於追蹤其代謝去向；用於此目的之合適的標記尤其包含放射性同位素標記，諸如碘 131、鎝 99、銥 111 及其類似物。標記亦可用於介導經修飾的蛋白質或肽在分析系統中之偵測；在此情況下，亦可使用放射性同位素以及酶標記、螢光標記、顯色標記及其類似物。若肽或蛋白質自身為靶向劑，諸如抗體或受體配位體，則使用所述標記尤其有幫助。

【0409】 類似鍵聯技術與其他技術一起可用於將本文揭示之經修飾的肽及蛋白質偶合至固體支撐物。當偶合時，此等經修飾的肽及蛋白質可接著用作親和力試劑以便分離會與其展現特異性反應之所期望的組分。

【0410】 最終，本發明之經修飾的肽及蛋白質可以用於與此等新化合物產生抗體特異性免疫反應性。此等抗體適用於多種診斷及治療應用，視未經修飾之肽或蛋白質之生物活性之性質而定。應瞭解，本發明提供了與本文中所述之 FVII 或 FVIIa 具免疫反應性的抗體。在一個實施例中，這類抗體可以用於區分或鑑別所投予之 CTP 修飾的凝血因子與內源性凝血因子。在另一實施例中，該等抗體可以用於定位所投予之 CTP 修飾的凝血因子。

【0411】 本領域的普通技術人員在參閱以下實例後將變得顯而易知本文揭示之其他目標、優點及新穎特徵，所述實例並不意欲為限制性的。另外，如上文所描繪並且如所附申請專利範圍部分中所主張的本文揭示之各種實施例及態樣中之每一者在以下實例中找到實驗支持。

實例

【0412】 通常，本文中使用的命名法和在本發明中使用的實驗室規程包括分子技術、生物化學技術、微生物技術和重組 DNA 技術。在文獻中充分解釋了這樣的技術。參見，例如，"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 等人,(1989)；"Current Protocols in Molecular Biology"第 I-III 卷 Ausubel, R. M., 編(1994)；Ausubel 等人，"Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)；Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)；Watson 等人, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York；Birren 等人(編) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)；在美國專利號 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 中闡述的方法；"Cell Biology: A Laboratory Handbook",第 I-III 卷 Cellis, J. E., 編(1994)；"Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 第三版；"Current Protocols in Immunology" 第 I-III 卷 Coligan J. E., ed. (1994)；Stites 等人(編), "Basic and Clinical Immunology" (第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)；Mishell 與 Shiigi (編), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)；可利用的免疫測定法係廣泛地描述在專利和科學文獻中，參見，例如，美國專利號 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 及 5,281,521；

"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., 編 (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., 與 Higgins S. J., 編(1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., 與 Higgins S. J., 編(1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., 編(1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984)及"Methods in Enzymology"第 1-317 卷, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 等人, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 其皆以引用方式併入本文中。在本說明書中提供了其它一般的參考文獻。

實例1

在 FVIII-缺陷型血友病小鼠中的 FVII-CTP₃ 可行性研究

【0413】 進行了試驗 FVII-CTP、FVII-CTP₂ 和 FVII-CTP₃ 採集物相對於市售 FVII 的 PK 譜和凝血活性的研究。相對於 FVII-CTP 和 FVII-CTP₂ 採集物或 rhFVII，FVII-CTP₃ 表現出改善的 PK 譜，同時維持它的凝血活性。為了進一步表徵 FVII-CTP₃ 體外和體內性能，製備了表現和分泌該蛋白的微型穩定庫，並開發了純化和活化方法。

【0414】 在當前的研究中，在 FVIII-缺陷型小鼠中試驗了 FVIIa-CTP₃ 的藥代動力學和藥效動力學性能。評價了該蛋白的 PK 譜。建立了基於 FVIIa 比活性的 PK 譜，並與市售產品 NovoSeven®進行對比。另外，試驗了在尾靜脈橫斷(存活研究)以後 FVIIa-CTP₃ 在 FVIII-缺陷型小鼠中誘導凝血的持久體內止血能力。

【0415】 研究目的：

【0416】 評價在以類似活性劑量單次靜脈內施用以後，FVIIa-CTP₃ 相對於市售的 rhFVIIa (NovoSeven®)在 FVIII-缺陷型小鼠中的藥代動力學和藥效動力學參數。

【0417】 確定在以類似活性劑量單次靜脈內施用 FVIIa-CTP₃ 和 NovoSeven®並隨後進行尾靜脈橫斷攻擊(存活研究)以後，FVIIa-CTP₃ 在 FVIII-缺陷型小鼠中在體內維持體內平衡的能力。

【0418】 FVII-CTP₃採集物的生產

【0419】 使用 pCI-DHFR 載體在 Dg44 細胞中在內部表現 FVII-CTP₃ (圖 1)。在有 25 ng/L 的維生素 K3 (Sigma)存在下，穩定的轉染彙集物 #71 係在搖瓶中生長。培養細胞懸浮液，並在存活率下降至 60-80%以後採集。將採集物過濾並冷凍在-70°C。

【0420】 採集物 FVII 抗原數量的判定：

【0421】 使用人 FVII ELISA 試劑組(Zymotest HyPhen)來判定 FVII 抗原數量(表 1)。計算每個彙集的彙集物批次之抗原數量。

Table 1: FVII-CTP₃ antigen level 表 1 : FVII-CTP₃ 抗原數量

FVII 抗原數量			
	PK-PD 研究		存活研究
	採集物 31A	採集物 31B	採集物 38
Av (µg/ml)	16.0	15.9	16.6
STD	1.5	0.0	0.8
%CV	9.1	0.1	4.9

【0422】 FVII-CTP₃純化製程 (圖 2A-2B)

【0423】 製程概要

【0424】 在短暫的純化研究以後，進行使用 2 個管柱的下述純化過程。VII-Select 親和性管柱(GE)和 Ceramic Hydroxyapatite 第 1 型(HA)，40 µm (Bio Rad)，純化 FVII-CTP₃ γ-羧化的富集蛋白。通過將經純化的 FVII-CTP₃ 在有 CaCl₂ 存在下於 2-8°C 培養隔夜而誘導自動活化。該純化過程是處於其最終的開發階段且正在優化中，因而儘管大部份的純化步驟是相似的，

但純化步驟的一部分在 2 個批次中是不同的。

【0425】 使用 10kDa 中空纖維或 Pellicon 盒的超微過濾/滲濾(UFDF)

【0426】 將澄清的採集物在 4°C 融化度過週末(2-3 天)。

【0427】 在批次 31 中，使用具有 10KDa 分子量截止值的中空纖維筒 (GE Healthcare 目錄號 UFP-10-C-4X2MA)，將澄清的採集物(12 升)濃縮 4 倍(在 2 個連續批次中)。將濃縮的採集物在 1-2 體積的 TBS (50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7.4)中滲濾。

【0428】 在批次 38 中，使用具有 10 KDa 分子量截止值的 Pellicon 2 (Millipore)盒，將澄清的採集物(8.5 升)濃縮 4 倍。將濃縮的採集物直接載入上 VII-Select 柱。

【0429】 兩次超濾均在冰上用冰冷的緩衝液進行。在載入之前將 UFDF 樣本進行 0.22 μ m 過濾。

【0430】 在 FVII-Select 管柱上進行擷取

【0431】 將 UFDF 或濃縮的採集物載入上 VII-Select 柱(XK16/20, CV18 ml)，用 TBS (pH 7.4)預平衡。用 50 mM Tris-HCl、0.5M NaCl (pH7.5)洗滌管柱，並用 50 mM Tris-HCl、1M NaCl 50% (v/v)、丙二醇(pH 7.5)洗脫 FVII-CTP₃。用相同的管柱，在 2 個連續循環中進行該過程。

【0432】 在陶瓷羥基磷灰石管柱上之基於 γ 羧化的分離

【0433】 將洗脫的產物用 10 mM 磷酸鈉(pH 6.8) 1:10 稀釋，並載入上陶瓷羥基磷灰石管柱(XK16/20, CV 24ml)。用 59 mM 磷酸鈉(pH 6.8)洗滌柱，並用 500 mM 磷酸鈉(pH 6.8)洗脫 γ -羧化的因子 VII 的富集流份。在相同柱上在 2 個連續循環中進行該過程。在每個批次，將 2 個循環的洗脫液合併，並濃縮至 1.7-2 mg/ml，並用 20 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 8.2)滲濾以減小體積和製備用於活化步驟的材料。

【0434】 FVII 活化

【0435】 將純化的 FVII-CTP₃ 稀釋至 1 mg/ml，並在 20 mM Tris-HCl、

100 mM NaCl 和 1 mM CaCl₂ (pH 8.2) 中在 2-8°C 溫育 24 小時。通過緩衝液更換(UFDF)為初步製劑緩衝液(20 mM 檸檬酸鹽, 240 mM NaCl, 13.3mM 甘胺酸, pH 6.9)來終止活化。

【0436】 FVII-CTP₃ 和 FVIIa-CTP₃ 分析性能：

【0437】 SDS-PAGE 和西方墨點法

【0438】 使用 Precision Plus 雙色蛋白標誌物(Bio-Rad)，將純化的 FVII-CTP₃ 和 FVIIa-CTP₃ 載入上 12% Tris-甘胺酸凝膠。通過用考馬斯亮藍試劑 (5 或 10 µg 蛋白/泳道)將凝膠染色，進行 SDS-PAGE 考馬斯分析。使用抗-人 FVII 多株抗體(R&D systems；AF2338)、抗-人 γ 羧化單株抗體(American Diagnostics 目錄號 499, 3570)和抗-CTP 多株抗體，進行西方墨點法(1 µg 蛋白/泳道)。在還原條件下，FVII-CTP₃ 遷移在 75 KDa，並且 FVIIa-CTP₃ 作為 2 個主要條帶遷移：在 50 kDa 的重鏈和在 25kDa 的輕鏈，在圖 3A-3H 中分別表示為條帶 2 和 3。

【0439】 該純化方法在減少雜質的同時顯著地富集了 FVII-CTP₃ 部分。純化過程產率是 25-30% FVII(根據 ELISA)。在純化過程中丟失的大多數蛋白具有低 FVII 顯色活性或沒有活性。基於考馬斯染色的 SDS-PAGE，還原的 FVIIa-CTP₃ 不僅含有預測的條帶。遷移至約 75 kDa 的條帶代表非活化的 FVII (圖 3A-3H，條帶 1)。該條帶由 2 個具有微小分子量差異的條帶組成，它們可能反映了不同的 γ-羧化含量。觀察到具有低於 20 kDa 的分子量的額外條帶。這在以前被報導為重鏈的降解產物。

【0440】 FVII-CTP₃ 顯色活性：

【0441】 使用市售可得的顯色活性試驗試劑盒 BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304)，進行 FVII-CTP₃ 採集物、過程中的流份和純化的 FVII-CTP₃ 相對於人血庫正常血漿的體外效價的對比評估。將 FVII-CTP₃ 採集物和蛋白系列稀釋，並通過將劑量回應曲線與正常人血漿的參考製劑進行對比來評估效價。在 FVII-CTP₃ 純化以後，顯色活性顯著改善，並且非活性

流份主要通過 HA 柱得到分離(圖 4)。在西方墨點法中觀察到 FVII 顯色活性和 FVII 檢測與單株抗-Gla 抗體之間的強關聯。由採集物的 EC50 值反映的 FVII 顯色活性的效價受羧化的和未羧化的 FVII 流份影響。在純化和富集 FVII-CTP₃ γ -羧化的級分之後，活性提高，從而證實 γ -羧化對 FVII 活性的重要貢獻(圖 4)。該參數對於適當的 FVII 體內活性而言是關鍵性的，並且將在殖株開發程式中進一步實現。

【0442】 通過 A280 的蛋白測定

【0443】 使用 ProtParam 演算法(<http://web.expasy.org/protparam>)，計算 FVII-CTP₃ 和 NovoSeven®的理論消光係數。所述計算是基於胺基酸序列。FVII-CTP₃ 和 NovoSeven®的計算的消光係數分別為 1.186 和 1.406。這些值代表在 280 nm 為 1 g/L 的吸光度。

【0444】 2 種蛋白之間的消光係數差異僅源自 FVIIa-CTP₃ 與 NovoSeven®相比的分子量增加，因為 CTP 缺少芳族殘基和半胱胺酸殘基，因而不會對吸光度做出貢獻。

【0445】 從 VII-Select 柱的洗脫開始，將通過 A280 的蛋白測定用於最終的 FVII 和用於純化的過程中樣本。

【0446】 FVIIa 抗原數量的確定

【0447】 使用人類 FVIIa ELISA 試劑盒(IMUBIND, American Diagnostica)來判定 FVIIa 抗原數量。計算每個批次的抗原數量。但是，該工具不用於判定注射劑量，因為它不代表活性產物的數量。

【0448】 Staclot® VIIa-rTF 的凝結測定

【0449】 FVIIa 源自單鏈 FVII 的鏈內裂解。天然組織因子(TF)是 FVIIa 的一種輔因子。在結合 TF 以後，FVII 會介導因子 X 活化為 Xa，同時它自身轉化成 FVIIa。可溶性組織因子是天然組織因子的細胞外部分。它不再可以通過自活化而活化 FVII，但是與組織因子結合的 FVIIa 可以將 FX 活化為 FXa。

【0450】 在該測定中使用的重組的可溶性組織因子(rsTF)利用 FVIIa 特異性來構建 FVIIa 凝血試驗。在有 FVIIa、鈣和磷脂存在下，rsTF 會導致血漿的凝固，而不會將 FVII 活化為 FVIIa。

【0451】 在該系統中觀察到的凝固時間與試驗樣本中的 FVIIa 含量具有反相關，FVII 在樣本中的存在沒有干擾。

【0452】 由 Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel)執行該測定。評價了 NovoSeven® (在重構之後)和 FVIIa-CTP₃ (在每個研究之前)的 FVIIa 活性。NovoSeven®活性與在瓶上報告的預期活性沒有關聯，但是差異可能是由於活性評價的不同方案。表 2 總結了每個體積的 FVIIa 凝血活性，沒有考慮蛋白濃度。

表 2：分批產品的 FVIIa 凝血活性

	FVIIa- 3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven ®	FVIIa- 3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven ®
活性 (U/ml)	1.3E+06	2.5E+05	1.3E+06	7.4E+05

【0453】 FVIIa-CTP₃的比活性

【0454】 基於 A280 來計算 FVIIa 比活性(將其計算為，活性/ml 除以蛋白濃度)，並呈現在表 3 中。當對比 2 種存在分子量差異的分子的比活性時，必須做 出補償，以便將活性標準化(即因為所述分子量差異，在 1 mg NovoSeven®中的活性部位的數目是在 FVIIa-CTP₃ 中的 1.185 倍)。在下述方程式中呈現了換算因子的計算：

$$\begin{aligned} \text{Normalized_SA} &= \frac{\text{SA(FVIIa-CTP}_3\text{)}}{\text{MW(FVII-CTP}_3\text{)}} \times \text{MW(Native_FVII)} = \\ &= \frac{\text{SA(FVIIa-CTP}_3\text{)}}{53419.5\text{Da}} \times 45079.1\text{Da} = \text{SA(FVIIa-CTP}_3\text{)} * 1.185 \end{aligned}$$

表 3：相對於 NovoSeven®的 FVIIa-CTP₃比活性

樣本	平均 值 A280	STDV (n=9)	%CV	消光係數	產物 濃度 (mg/ml)	U/ml	特定活性		比 NovoSev en® 減少 的倍數
							U/mg protei n	U/mg FVIIa	
NovoSev en®	1.274	0.031	2.398	1.406	0.906	8.36E+05	9.23E +05	9.23E +05	1.0
FVIIa- CTP ₃	4.396	0.092	2.094	1.186	3.706	7.23E+05	1.95E +05	2.31E +05	4.0

【0455】 FVIIa-CTP₃ PK-PD 研究：

【0456】 研究概要

【0457】 以 6.4E6 U/kg 體重(160,000 U/動物)的劑量將 FVIIa-CTP₃ 和 rhFVIIa (NovoSeven®, NS)在單次靜脈內注射中施用給 C57B FVIII-缺陷型小鼠。可替代地在給藥後 0.166、0.5、2、4、8、12、24、34、48、58 和 72 小時，從 4 隻小鼠在眼眶抽取血液樣本(表 4)。在取樣後立即製備檸檬酸鹽化的血漿(0.32%)，並在分析之前在-20°C 儲存。評價 FVIIa 凝血活性程度，並進行詳細的 PK 分析。由 Omri Laboratories (Nes-Ziona, 以色列)進行研究。

表 4：研究概要

A	rhFVIIa	4	IV	1.6e5	200	0 (Pre-dose) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa-CTP ₃	4	IV	1.6e5	200	0 (Pre-dose) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

【0458】 FVIII-缺陷型小鼠中的 FVIIa-CTP₃ PK 譜

【0459】 使用 Staclot® VIIa-rTF 試劑組(Stago, Parsippany, NJ)，定量血液樣本中的 FVIIa 活性。計算每種蛋白的藥物動力學曲線，其代表在每個

時間點 4 隻動物的平均值。圖 5 呈現了整個實驗中 FVIIa 的 PK 曲線。在表 6 中呈現了 FVIIa 的回收率。在表 7 中呈現了 PK 參數的概述。

【0460】 表 5 總結了施用 NovoSeven®或 FVIIa-CTP₃以後的凝血活性值。FVIIa-CTP₃ 和 NovoSeven®在給藥後半小時達到最大活性。NovoSeven®的最高活性值僅達到 FVIIa-CTP₃ 的最大活性值的 43%。FVIIa-CTP₃ 凝血活性維持較長時間段，從而證實了延長的活性。NovoSeven®治療的小鼠的凝血活性在晚於 12 小時的時間點是不可檢測的，而 FVII-CTP₃ 治療的小鼠在給藥後 48 小時繼續保留可測量的活性(表 5 和圖 5)。

【0461】 通過給藥後最高活性測得，與基於體外分析的預期活性相比，3 個串聯 CTP 複本向 FVIIa 的添加使回收率升高了 100%(表 6)，並使半衰期和平均停留時間(MRT)增加了 5 倍。暴露時間(AUC)增加了 3 倍(表 7)。

表 5：單次靜脈內注射以後的 FVIIa 凝血活性

投藥之後的時間(小時)	平均 FVIIa 凝固活性 (U/ml)	
	FVIIa-CTP ₃	NovoSeven®
0.16	6.8E+07	3.2E+07
0.5	9.7E+07	4.3E+07
2	2.1E+07	3.9E+06
4	7.7E+06	7.3E+05
8	2.7E+06	4.2E+04
12	3.7E+05	6.2E+03
24	2.4E+04	BLQ
34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

表 6：FVIIa-CTP₃回收率

治療組	測 試 物件	單 位 / 動 物數量	實際施用劑 量(U/ml)	* 預 期 的 Cmax (U/ml 血 液)	Cmax (U/ml)	%回收率
A	rFVIIa	1.60E+05	1.20E+06	1.40E+05	4.25E+04	30
B	FVIIa-CTP ₃	1.60E+05	1.29E+06	1.50E+05	9.74E+04	64.6

*預期的 Cmax 源自施用劑量除以血液體積

表 7：FVIIa-CTP₃相對於 NovoSeven®的 PK 參數

PK 參數	NovoSeven®	FVIIa-CTP ₃
半衰期- α (0.5-12hr)	0.94	1.57
半衰期- β (12-48hr)	NA	4.62
AUC (mU*hr/ml)	5.80E+07	1.80E+08
Vd/Kg (ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg (ml/hr/Kg)	1034	356
MRT (hr)	1.3	6.7

【0462】 凝血酶產生測定(TGA)

【0463】 凝血酶的產生是凝血級聯的一個基礎部分，這樣，特定個體可以產生凝血酶的狀況的估計可以與出血或血栓形成的風險關聯。當分析凝血酶產生時，通常測量的變數包括：延遲時間，達到凝血酶產生峰值的時間，峰值，內源性凝血酶潛勢[ETP](即，在曲線和尾巴下的面積)，凝血圖(thrombogram，“TG”)的時程。在延遲時間以後，觀察到凝血酶的爆發。但是，凝血發生在延遲時間結束時，此時所有凝血酶中的超過 95%尚未形成。使用補充了人血友病血漿的 Thrombinoscope 試劑，在 Omri Laboratories 進行凝血酶產生測定。TGA 反映了源自 NovoSeven®和 FVIIa-CTP₃ 注射的小鼠血漿中的凝血能力。圖 6A-6C 呈現了施用 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®以後小鼠血漿的 TGA 參數值。在 FVIIa-CTP₃施用以後，所有 3 個參數(凝血酶產生速率、產生的凝血酶的最大量和 KIIa)證實了 FVII-CTP₃ 勝過 NovoSeven®治療的優點。這進一步強化了 FVII-CTP₃ 相對於 NovoSeven®的潛在長效優越性的概念。

【0464】 FVIIa-CTP₃尾靜脈橫斷(TVT)研究：

【0465】 研究概要

【0466】 得自 FVIIa-CTP₃的 PK/PD 試驗的資料會提供對 FVIIa- CTP₃的

功能性的洞察，並證實，FVIIa-CTP₃ 與 NovoSeven®相比具有藥代動力學優點。但是，該蛋白在創傷性事件以後誘發體內凝血的能力尚未得到證實。為了評價 FVIIa-CTP₃的停止出血的能力，將相同的 FVIII-缺陷型小鼠模型用於出血攻擊。

【0467】 給 FVIII-缺陷型小鼠施用 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®的單次靜脈內注射。以提供等同 FVIIa 活性(1.6E05 單位，200µl)的量給小鼠施用藥物，所述量根據在 FVIIa 凝血活性測定中評價的每種藥物的效價來計算(表 8)。由於 FVIIa-CTP₃ 的降低的活性，施用的劑量為 9 mg/kg NovoSeven®和 40 mg/kg 的 FVII-CTP₃ 給對照組注射 200 µl 媒介物。

【0468】 在施用後 15min(注射 1)、24 小時(注射 2)或 48 小時(注射 3)，離尾尖 2.7cm 橫斷尾靜脈，並記錄小鼠存活 24 小時。

表 8：經注射的樣本的評價

注射號碼	NovoSeven®			FVIIa-CTP ₃			
	蛋白濃度 (mg/ml)	活性 (U/ml)	特定活性 (U/mg)	蛋白濃度 (mg/ml)	活性 (U/ml)	特定活性 (U/mg)	特定活性 (經均一化)
1	0.91	8.0E+05	8.8E+05	3.63	6.6E+05	1.8E+05	2.2E+05
2	0.92	8.3E+05	9.0E+05	3.81	7.8E+05	2.0E+05	2.4E+05
3	0.89	8.8E+05	9.9E+05	3.68	7.3E+05	2.0E+05	2.3E+05

【0469】 通過 A280 確定蛋白濃度。

【0470】 結果

【0471】 將 3 次注射(5 隻動物 x 3 次注射)在注射媒介物的對照組中的資料總結並呈現在圖 7A-7D 中。在尾靜脈橫斷以後 24 小時觀察到 30%存活。

【0472】 在 FVIIa 施用後 15 分鐘執行尾靜脈橫斷以後，NovoSeven®和 FVIIa-CTP₃ 治療的小鼠表現出適當止血活性。在 FVIIa-CTP₃ 和

NovoSeven®治療的動物中觀察到 100%存活率(圖 7A-7D)。

【0473】 在施用後 24 小時執行尾靜脈橫斷以後，最明顯地觀察到在 PK/PD 研究中證實的 FVII-CTP₃ 的降低的清除率。觀察到 NovoSeven®的存活率的下降。類似於對照組，在 10 小時內觀察到 50%死亡。同時，90%的 FVIIa-CTP₃ 治療的小鼠存活(圖 7A-7D)。該結果強調了 FVIIa-CTP₃ 治療的持久效力。

【0474】 施用後 48 小時，在用 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®治療的組中證實了存活率的下降(圖 7C)。觀察到 FVIIa-CTP 小鼠中的輕微改善，但是差異沒有達到統計顯著性。

【0475】 討論：

【0476】 CTP 與重組蛋白的融合會延長蛋白的循環半衰期，同時維持可比較的活性。儘管超過 70 KDa 閾值尺寸的蛋白的清除率降低背後的機制就腎清除率而言得到良好理解，在 CTP 融合以後實現了額外保護。認為 CTP 融合會掃除蛋白遮罩並保護它免於蛋白水解性裂解，以增加它的殘餘分子量(由於高負電荷)和降低它對肝清除受體的親和力。

【0477】 本研究的目的是，提供 CTP 與 FVII 的融合對蛋白半衰期和清除率的影響的具體洞察，並且也解決在該修飾以後它的比活性的範例。以類似劑量(基於單位)給 FVIII-缺陷型小鼠施用 FVIIa-CTP₃ 或重組市售的 FVIIa (NovoSeven®)的單次靜脈內注射，並進行基於 PK 活性的分析。FVIIa-CTP₃ 表現出優良的壽命，如它的半衰期和 AUC 分別增加 5 和 3.5 倍所反映的。通過 Staclot®活性試劑盒計算的 FVIIa-CTP 除以通過 A280 測量的蛋白濃度的比活性(U/mg)被證實比 NovoSeven®的比活性低 4-5 倍。

【0478】 為了建立關於 CTP 如何影響 FVIIa 體內止血效應的理解，研究了 FVIIa-CTP₃的減少出血的能力。在血友病小鼠模型的尾靜脈橫斷出血模型中，rFVIIa 施用可以提高攻擊的動物的存活率，並避免它們出血至死亡。在本文描述的研究中，給動物施用 FVIIa-CTP₃ 或 NovoSeven®當在給藥後

0.25 小時執行橫斷時，兩種分子都能夠維持體內穩態。當在給藥後 24 小時進行尾巴橫斷時，證實了 FVIIa-CTP₃ 治療組的顯著延長的活性持續時間。媒介物治療組的存活率高於預期值，且高於在以前的研究中得到的值(50% 相對於在以前的研究中的 20%，資料未顯示)。在更早的時間點(包括在給藥後 36 小時)進一步評價了治療的動物的存活百分比。

【0479】 綜上所述，證實了 FVIIa-CTP₃ 在血友病小鼠中具有增加的活性持續時間，其被解釋為與 NovoSeven®相比更長的止血效應持續時間。收集的資料提示，CTP 與 FVII 的融合是具有顯著改善血友病患者中的預防性處理的潛力的技術。

實例2

MOD-5014 相對於市售重組 hFVIIa 之生化特性 – 羧基端肽(CTP)對因子 VIIa 活性的影響

計畫理論基礎與概述

【0480】 這些研究係設計來評估 MOD-5014 相對於市售重組 hFVIIa (本文中稱為 MOD-5000) 之生化特性。

【0481】 該等研究係檢測：

- MOD-5014 的合成受質裂解
- 由合成受質裂解所測量之 MOD-5014 的組織因子(TF)結合
- 由因子 X (FX)活化所測量之 MOD-5014 的結合
- 通過 TF 結合的 MOD-5014 之 FX 活化動力學
- 由 FX 活化之 MOD-5014 的脂質結合
- 由脂質結合的 MOD-5014 之因子活化動力學
- 通過抗凝血酶之 MOD-5014 去活化
- 通過 TFPI 之 MOD-5014 去活化

【0482】 總體來說，相對於 MOD-5000，數據暗示了 MOD-5014 具有類

似的作用機制，且其催化活性稍微降低。這些結果展現出 TF 結合的 MOD-5014 的活性稍微降低且活性稍微更為降低，與 TF 無關。

【0483】 這些影響主要體現在反應速度而不是反應的程度上，且整個時間過程的反應可以完成測量。

【0484】 稍微降低的 AT 抑制速度暗示了 MOD-5014 在體內的半衰期延長且具有適當的抑制反應。

【0485】 實驗材料

- MOD-5014 GMP-1: 2.5 mg/ml (基於 A280)
- NovoSeven Lot# CU60430: 0.943 mg/ml (基於 A280)，稱為 MOD-5000。

【0486】 mod-5014 的合成受質裂解

【0487】 理論基礎：合成受質的裂解應完全視有功能的活性位置之可得性。

【0488】 方法：MOD-5000 與 MOD-5014 以莫耳計係稀釋成相同濃度。接著添加相同的濃度至一固定濃度的受質 Pefachrome FVIIa（甲磺醯基-D-環己基丙胺醯基-2-胺基丁醯基-精胺酸-對硝基苯胺），且受質的裂解係由黃色的外觀來監測。

【0489】 結果

【0490】 濃度：FVIIa 360 nM；受質 500 μ M。

【0491】 分析：在 405 nm 的吸光值係使用已知的消光係數而轉換為對硝基苯胺的濃度。對硝基苯胺的濃度係與時間相對進行做圖，以判定受質裂解的速率。

【0492】 將數據擬合至：

$$rate = k_1[FVIIa]$$

【0493】 $k_1 = 27.5 \text{ mol pNA/min/mol VIIa}$

【0494】 結論：以莫耳計，MOD-5000 與 MOD-5014 有相同的受質裂解速率（圖 8）。對於接續的研究，受質裂解的測量係做為稀釋與抽吸的對

照。

由合成受質裂解所測量之 mod-5014 的 Tf 結合

【0495】 理論基礎：當因子 VIIa 結合到 TF，因子 VIIa 會發生構形改變，導致受質裂解速率的增加。這表示所增加的受質裂解可用來監測因子 VIIa 結合到 TF 的情況。

【0496】 方法：將各種濃度的 MOD-5000 與 MOD-5014 添加到一固定濃度的 TF 中並培養 5 分鐘。

【0497】 添加受質(Pefachrome FVIIa)。藉由黃色外觀來監測受質在 405 nm 的裂解。

結果：

【0498】 濃度：FVIIa 0-25 nM; TF 8.7 nM；受質 500 μM。

【0499】 分析：當 TF 的濃度遠高於預期的 Kd，在低濃度時所有的 FVIIa 應該結合 TF。受質裂解速率會等同於 VIIa/TF 複合物的裂解速率。一旦 FVIIa 的濃度超過 TF 濃度，受質裂解速率應下降至遊離 FVIIa 的裂解速率。由於 FVIIa 與 TF 形成莫耳數 1:1 的複合物，受質裂解速率的改變發生時的 FVIIa 濃度為所評估 FVIIa 濃度的檢核。

【0500】 將數據擬合至：

$$rate = k_1 [VIIa] + k_2 [VIIa/TF]$$

	MOD-5000	MOD-5014	
k ₁	27.5	27.5	mol pNA/min/mol VIIa
k ₂	365	357	mol pNA/min/mol VIIa/TF

【0501】 結論：MOD-5000 (Novoseven)與 MOD-5014 在所期望的 TF 濃度(8.7 nM)係顯示出相同的反折點（圖 9）。這確認了藉由受質裂解預測 MOD-5000 與 MOD-5014 的莫耳濃度是正確的。當結合 TF(98%)時，MOD-5014 相對於 MOD-5000 係有非常低的受質裂解速率（圖 9）。

由因子 X 的活化測量 mod-5014 的 TF 結合

【0502】 理論基礎：通過因子 VIIa 之 FX 裂解相對於通過 FVIIa/TF 複

合物的裂解是相對緩慢的。因此，可藉由測量 FX 的活化速率來評估 FVIIa 與 TF 的結合。

【0503】 方法：將各種濃度的 MOD-5000 and MOD-5014 添加到固定濃度的 TF 中，測量 FX 活化的速率。通過合成受質 Pefachrome FXa （甲氧羰基-D-環己基丙胺鹽基-甘胺鹽基-精胺酸-對硝基苯胺）的裂解來評估因子 X 的活化。合成受質的裂解係通過一標準曲線而轉換成 FXa 濃度。FVIIa 與 FVIIa/TF 都未以可察覺到的速率裂解 FX 受質。

【0504】 結果

【0505】 濃度： FVIIa 0-2 nM; TF 10 pM; FX 135 nM；受質 500 μM。

【0506】 血漿中的因子 X 濃度為 8 μg/mL (~ 135 nM)。

【0507】 分析：FX 活化的速率應隨著 FVIIa 結合 TF 而增加。一旦所有的 TF 與 FVIIa 飽和，FX 活化的速率將達到最大值（圖 10）。

【0508】 將數據擬合至：

$$v = V_{max} \frac{[FVIIa]^n + [TF] + K_d^n - \sqrt{([FVIIa]^n + [TF] + K_d^n)^2 - 4[FVIIa]^n[TF]}}{2[TF]}$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.40	1.30	nM FXa/min
K_d	3.3	3.0	pM
Hill value	0.93	0.91	

【0509】 結論：FVIIa 與 TF 的結合係存在著非常輕微的負協同性（Hill 值<1）。這情況對於 MOD-5000 與 MOD-5014 也是一樣的。當與 TF 結合時，MOD-5014 的 FX 活化速率相對於 MOD-5000 係稍有降低(93%)。MOD-5014 對於 TF 的親和性係相當於 MOD-5000 的親和性（圖 10）。

以 FX 活化的速率做為 FX 濃度的函數

【0510】 理論基礎：當結合 TF 時，所述稍有降低的 MOD-5014 活化速率可能是其一旦結合到複合物之對 FXa 的親和性降低或 FX 的轉換減少之結果。測量 FX 的活化速率做為 FX 濃度的函數係建立了該複合物的動力學參數。

【0511】 方法：將 FX 的各種濃度與一固定濃度的 FVIIa/TF 複合物一起培養。

【0512】 因子 X 的活化係以合成受質(Pefachrome FXa)的裂解來評估。合成受質的裂解係通過一標準曲線而轉換成 FXa 濃度。

結果

【0513】 濃度：FVIIa 1 nM; TF 5 pM; FX 0-1500 nM；受質 500 μM。

【0514】 分析：於添加更多的 FX 時，更多的 FVIIa/TF 複合物應將 FX 結合到全部 FVIIa/TF 複合物已結合 FX 的位置處。因此，FX 的活化速率應隨著 FX 的濃度增加而增加，其曲線形狀漸近地接近最大速率（圖 123）。

【0515】 將數據擬合至：

$$v = V_{max} \left(\frac{[S]}{K_m + [S]} \right)$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.78	1.64	nM FXa/min
K_m	140	120	nM

【0516】 結論：當與 TF 結合時，MOD-5014 之 FX 轉換(92%)相對於 MOD-5000 係稍微降低。FX 與 MOD-5014/TF 複合物的結合係與其和 MOD-5000/TF 複合物的結合相同（圖 11）。

由 FX 的活化測量 MOD-5014 的脂質結合

【0517】 理論基礎：因子 X 在血小板上的活化被認為是有助於 FVIIa 的止血作用。此血小板活性被認為會在低 TF 環境中發生，或在沒有 TF 的情況下發生。不具有 TF 的因子 X 活化係可在脂質微脂粒上進行研究。

【0518】 方法：在脂質上通過 FVIIa 的因子 X 活化係為將酶(FVIIa)與蛋白受質(FX)結合的作用。脂質比率為 PC:PE:PS 41:44:14，設計來模擬高度活化之血小板的組成。所述脂質係製備成單層微脂粒(200 nm)。將濃度遞

增的微脂粒加到 FVIIa 與 FX。因子 X 的活化係通過合成受質(Pefachrome FXa)的裂解來評估。合成受質的裂解係通過一標準曲線而轉換為 FXa 濃度。

結果

【0519】 濃度：FVIIa 20 nM; FX 500 nM；脂質 0-1000 μ M；受質 500 μ M。

【0520】 分析：FXa 生成的速率係與脂質微脂粒濃度相對進行做圖（圖 12A）。如同預期的，由於有更多的表面積可用於反應，FXa 的生成係隨著脂質趨增的濃度而增加。在有足夠高的脂質濃度下，反應速率會隨著 FVIIa 與 FX 分離到不同的脂質微脂粒上而降低。對於此系統而言是期望有這樣的範本響應。數據並未擬合到方程式中，且所顯示的線條僅用於目視參考。在 MOD-5000 與 MOD-5014 之的 FXa 生成速率差異並不是因為對脂質的親和性的差異。這顯示於圖 12B 之中，其中 FXa 的生成速率相對於每一者的最大值係與脂質濃度相對進行做圖。

【0521】 結論：在沒有 TF 的情況下，FX 的活化速率在 MOD-5014 中 (~60%)係比 MOD-5000 相對較低。MOD-5014 對於脂質的親和性係與 MOD-5000 相同。

通過結合脂質的 MOD-5014 之 FX 活化動力學

【0522】 理論基礎：在沒有 TF 的情況下，MOD-5014 相對於 MOD-5000 所降低的 FX 活化速率可能是其一旦結合脂質表面上的酶之對 FXa 的親和性降低或 FX 的轉換減少之結果。

【0523】 方法：各種 FX 濃度係與一固定濃度的 FVIIa 與脂質微脂粒一起培養。因子 X 的活化係通過合成受質(Pefachrome FXa)的裂解來評估。合成受質的裂解係通過一標準曲線而轉換成 FXa 濃度。

結果

【0524】 濃度：FVIIa 20 nM; FX 0-2500 nM；脂質 100 μ M；受質 500 μ M。

【0525】 分析：於添加更多的 FX 時，更多在脂質表面上的 FVIIa 應將 FX 結合到全部 FVIIa 結合 FX 的位置處。於該位置處的反應係受限於 FX 活化的速率。因此，FX 的活化速率應隨著 FX 的濃度增加而增加，其曲線形狀漸近地接近最大速率。如同預期的，FVIIa 對 FX 的親和性係於缺少 TF 的情況下降低，且 FXa 的生成速率係於缺少 TF 的情況下降低（圖 13）。

【0526】 Data was fitted to: 將數據擬合至：

$$v = V_{max} \left(\frac{[S]}{K_m + [S]} \right)$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	0.253	0.115	nM FXa/min
K_m	878	848	nM FXa/min

【0527】 結論：在沒有 TF 的情況下，FX 在脂質表面上的活化速率在 MOD-5014 中(45%)係比 MOD-5000 相對較低。於脂質表面上 FX 對於 MOD-5014 的結合係與其對於 MOD-5000 的結合相同（圖 13）。

通過 AT 之 MOD-5014 的去活化

【0528】 理論基礎：體內 FVIIa 清除率的有效部分被認為是通過 FVIIa 與 AT 的複合物之形成。僅於 FVIIa 與 TF 結合時，此反應速率可在體外測量。為了以可測量的速度進行，體外反應還需要高濃度的肝素，其被認為可模擬天然存在的醣胺聚醣的作用。

【0529】 方法：因子 VIIa 係與 TF 一起培養以可形成所述複合物。該複合物係與 AT 及肝素一起培養。以定時間隔添加聚凝胺（海美溴鉍）來停止反應以中和肝素。通過合成受質(Pefachrome FVIIa)的裂解來測量剩餘的 FVIIa/TF 活性。在測定中使用的濃度下，聚凝胺不會改變受質的裂解。

結果

【0530】 濃度：FVIIa 10 nM; TF 11 nM; AT 1 μM；肝素 5 U/mL; FVIIa/TF 8.2 nM；聚凝胺 100 μg/mL；受質 500 μM。

【0531】 分析：以受質裂解速率所測量之 FVIIa/TF 濃度係與以分鐘計的時間相對進行做圖（圖 14）。如同預期的，AT/肝素會抑制 FVIIa，造成 FVIIa/TF 活性的喪失。

【0532】 將數據擬合至：

$$v = \frac{V_{max}}{1 + e^{k \cdot time}}$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V ₀	11.89	11.93	
k	0.354	0.217	min ⁻¹

【0533】 結論：在 T=0 的活性相似值表明有等量的 MOD-5000 與 MOD-5014 存在於該反應之中。MOD-5014 係經抑制(62%)而比 MOD-5000 稍慢一些（圖 14）。該二反應係續行而完全抑制。

通過 TFPI 的 MOD-5014 去活化

【0534】 理論基礎：TFPI 是 FVIIa/TF 複合物的生理抑制物。TFPI 的 K2 結構域係與 FXa 形成一初始複合物。此複合物係與 FVIIa/TFPI 結合，其中 TFPI 的 K1 結構域係與 FVIIa 交互作用。因此，通過 FVIIa/TF 的 FX 活化應會導致受抑制的複合物並導致 FVIIa-TFPI 停止作用。

【0535】 方法：因子 VIIa 係與 TF 一起培養以形成一複合物。將該複合物添加至 TFPI/FX/FXa 受質。通過合成受質(Pefachrome FXa)的裂解來測量評估因子 X 的活化。合成受質的裂解係通過一標準曲線而轉換為 FXa。

結果

【0536】 濃度 – 抑制：FVIIa 1 nM; TF 20 pM; FX 135 nM; TFPI 0-5 nM；受質 500 μM。

【0537】 分析：如同預期的，初期的 FXa 生成係以與在所有的反應中之相同速率發生。在存有 TFPI 的情況下，FXa 的生成速率係隨著該 FVIIa/TFPI 複合物被 TFPI/FXa 抑制而減緩（下面兩個篇幅）。TFPI 複合物的停止作用在較高濃度的 TFPI 下會更快速發生（下面兩個篇幅）。在 FVIIa/TFPI 停止作用之前形成的 FXa 數量係為 TFPI 與 FVIIa/TF 交互作用

的一個量度。由於 MOD-5014 的 FXa 生成速率稍有降低且因而減緩 FXa/TFPI 複合物的形成，與 MOD-5014 作用的反應會比與 MOD-5000 作用花更長的時間來達到平線區。

【0538】 結論：如較上面的篇幅所述，TFPI 抑制 FXa 的 MOD-5014/TF 之濃度依存性係與對 MOD-5000 之濃度依存性相似。MOD-5014 可能對 TFPI 的抑制稍微更敏感(124%)；或者，這可能是 FXa 生成速率稍慢的人為誤差。

實例3

產生 CTP 修飾的活化因子 VII

【0539】 目的

【0540】 所述生產方法的目的係藉由重組 DNA 科技、使用在成分確定之培養基中的 CHO 細胞來開發批次饋料上游製程，隨後是一個穩健且可擴展的下游製程來純化高度糖基化及高度 γ 羧化的 MOD-5014。換言之，其係為產生及純化具有最高含量的 γ 羧化之 MOD-5014，並有效移除製程及生產相關的雜質。重要的是分析 O 型糖鏈、N 型糖鏈、唾液酸百分比、氧化相關形式、效價（由 STA-CLOT 分析測試）、Gla 結構域的百分比（或替代性地，未羧化的麩胺酸殘基百分比）及未活化的 FVII 百分比。

【0541】 生產流程

【0542】 轉染與穩定植株的選擇

【0543】 將編碼 MOD-5014 的 cDNA 轉染製 CHO 細胞內（dhfr-陰性的 CD DG44 細胞，其適於生長在無蛋白的培養基中並懸浮生長）且藉由限數稀釋步驟來產生穩定植株。對有最高生成表現的植株進行擴增，並選擇最終的植株供進一步的發展。

【0544】 貫穿主細胞庫及工作細胞庫(MCB；WCB)之衍生始終，使用無動物組分培養基。穩定植株藉由在細胞培養物中之限制稀釋步驟來分離。

最高製造植株用濃度增加之可選擇藥劑擴增。基於植株群體倍增數量(PDL)、CTP 修飾的因子 VII 之生產率(皮克/細胞/天, PCD)及在所選擇培養基中獲得細胞密度之最大值, 分離最高製造植株, 且將其用於製備研發庫, 接著製造合格的主細胞庫(MCB)及工作細胞庫(WCB)。

【0545】 上游製程:

【0546】 表現 MOD-5014 之穩定植株 CHO 細胞係接種自主細胞庫(MCB)之單一小瓶(圖 16 的步驟 1 且逐步擴增至 1000 L 或 2000 L 的生物反應器, 在補充有維生素 K 之無血清且成分確定的培養基中使用批次饋料方法(圖 16 之步驟 2-4))。

【0547】 測試生產細胞培養上清液之生物負荷、細菌內毒素、生產率及外源病毒。所述製程使用 50 公升及 200 公升生物反應器(用於接種的生物反應器, 圖 16 的步驟 3)及 1000 或 2000 公升生物反應器(用於規模放大)進行。所有產物接觸表面均為拋棄式的, 而非拋棄式的產物接觸設備為產物專用的。此等元件設備在批次之間係經清潔及消毒。培養物擴增至 50 公升及 200 公升生物反應器, 隨後接種在 1000 公升或 2000 公升生物反應器中。最終規模放大及批次饋料生物反應器生產係於 2000 公升拋棄式生物反應器中進行。細胞之移除係使用拋棄式過濾器系統(Millipore 深度過濾器)實現。

【0548】 在 1000 或 2000 公升生產用生物反應器中進行細胞繁殖(步驟 4, 圖 16)

【0549】 培養物在生物反應器中在 37°C、50%溶解氧(DO)及 pH 7.1 下培養約 11 天(視細胞之存活率而定)。在運作期間, pH 偏移至 6.9, 直至收集。在第 4 天, 添加進料(細胞促進物 6 (Cell Boost 6))及維生素 K₃。再者, 將 DMSO 添加至生物反應器中。將葡萄糖進料溶液添加至培養物中, 以便維持所期望的濃度, 且添加 1M 碳酸氫鈉藥團以便維持所期望的培養物濃度。使用預定義準則進行採集。在前四天期間, 每天對細胞培養物進

行取樣以用於細胞計數、存活率及代謝分析。自第 5 天起，每天兩次對培養物進行取樣以用於細胞計數、存活率及代謝分析，且自第 9 天起，亦用於利用 Elisa 或 HPLC 親和性法之特定生產率。

【0550】 本文中呈現之實例係使用批次饋料模式，但本領域中熟習此項技術者可使用大體上類似的生長與純化流程發展灌注模式。可替代地，本領域中熟習此項技術者可發展其中培養持續時間可甚至高達 7-120 天之灌注方法。

【0551】 細胞採集及儲存(圖 16 之步驟 5)

【0552】 使用拋棄式過濾方法系列進行採集。為了使採集液澄清，進行深度過濾及 0.2 μm 過濾。澄清之後為 0.45/0.2 μm 過濾。沖洗深度過濾器，且用空氣將殘餘液體吹出系統。過濾製程以 $\leq 15 \text{ L/min}$ 之泵送速度及最大定義之壓力運作。隨後，過濾器用 Tris-HCl 緩衝液洗滌，且用加壓空氣吹出以增加產物回收率。

【0553】 測試澄清的採集液之生物負荷、細菌內毒素、利用 RP-HPLC、SDS-PAGE、西方墨點法、HPC Elisa 分析之特定蛋白含量、殘餘 DNA、活體外病毒分析、病毒樣粒子、S+L-及黴漿菌。

【0554】 純化及活化製程

【0555】 純化流程係描述於圖 17 中。該純化流程係基於四個層析管柱。蛋白質係使用親和性層析法、混合模式層析法、疏水性作用層析法及陰離子交換層析法進行純化。蛋白質係於陰離子交換層析步驟進行活化。純化製程亦包含病毒去活化及奈米過濾步驟。

【0556】 超微過濾及滲濾 1 – UFDF1 (步驟 6)

【0557】 澄清的採集液係使用基於切向流過濾(TFF)之超微過濾及滲濾(UF/DF)步驟。濾筒標稱分子量截斷大小為 30 kDa。藉由 ELISA、HPLC 親和性方法測試經濃縮及滲濾之採集液的特定蛋白含量，且使用 SDS-PAGE、西方墨點法及/或 HCP ELISA 來評估內毒素與生物負荷。

【0558】 藉由培養進行之病毒去活化(步驟 7)

【0559】 材料依序經由 Millipore 0.22 μm 過濾器過濾至無菌混合袋中。接著，添加溶液以使病毒內含物去活化，例如添加 Tris/10% Triton 溶液至最終濾液體積，使 Triton 濃度達至 1%(w/w)。在培養之後，於加載在親和性管柱上之前，再次用 0.2 μm 過濾器單元過濾產物溶液。經過濾的病毒去活化產物係使用 SDS-PAGE 與西方墨點法分析來測試其細胞內毒素與生物負荷。

【0560】 親和性層析法（步驟 8）

【0561】 親和性管柱係用於此步驟。管柱以預定義床高度填充。視產物的量而執行此步驟 2-4 個循環。由於在分析中由 Triton 引起之干擾，故在添加 Triton 之前測定負荷中之特定蛋白。該親和性管柱係經平衡，且以病毒去活化的彙集液裝填，且接著洗滌。進行第二次洗滌，且將材料溶析且接著儲存在 2-8°C 下以便次日處理。所有層析步驟均以下流模式進行。

【0562】 使用本領域所熟知的技術（包含在 280 nm 下的吸光度、RP-HPLC、AIEC HPLC、SEC-HPLC、HCP ELISA、SDS-PAGE 及西方墨點法），測試溶析物之特定蛋白產物、細菌內毒素、殘餘 DNA、唾液酸含量、 γ 羧化百分比、帶電荷的 N 型醣鏈、殘留的濾出親和性配位體、及生物負荷。

【0563】 複合模式或混合模式層析（步驟 9）

【0564】 裝填有複合模式或混合模式層析樹脂的管柱係用於此步驟。此管柱為呈預定義柱床高度之填充管柱。視產物的量而執行此步驟 1-4 個循環。管柱係經平衡且以經稀釋的親和性溶析液進行裝填，接著洗滌，並採集溶析液儲存於 2-8°C 下直至進一步處理。使用本領域所熟知的技術（包含在 280 nm 下的吸光度、RP-HPLC、AIEC HPLC、SEC-HPLC、HCP ELISA、SDS-PAGE 及西方墨點法），測試溶析物之特定蛋白產物、細菌內毒素、殘餘 DNA、唾液酸含量、 γ 羧化百分比、帶電荷的 N 型醣鏈、殘

留的濾出親和性配位體、及生物負荷。

【0565】 疏水性相互作用層析(HIC) (步驟 10)

【0566】 HIC 樹脂係用於此步驟。此管柱為呈預定義柱床高度之填充管柱。視產物的量而執行 HIC 層析 1-4 個循環。HIC 裝填物係藉由用硫酸銨調整所述複合模式或混合模式蛋白管柱溶析液而製備。管柱係經平衡且以經調整及 0.2 μm 過濾之複合模式或混合模式管柱溶析液進行裝填，接著洗滌。產物係經溶析，且接著儲存在 2-8°C 下直至進一步處理。藉由在 280 nm 下的吸光度及 SEC-HPLC 測試溶析物之特定蛋白濃度。也測試溶析物之細菌內毒素及生物負荷。

【0567】 HIC 溶析液之超微過濾及滲濾（步驟 11）

【0568】 將 HIC 溶析液濃縮及滲濾以減少體積，且製備用於陰離子交換管柱步驟之材料。一旦 pH 及電導率經測定在範圍中，即使系統進行排液並使用 0.5/0.2 μm 的過濾步驟而過濾至無菌袋中。將經濃縮、滲濾之 HIC 溶析液之最終體積在 2-8°C 下儲存直至進一步處理。使用包含在 280 nm 下的吸光度、RP-HPLC、AIEX HPLC、SEC-HPLC、HCP ELISA、SDS-PAGE 及西方墨點法，測試溶析物之特定蛋白產物、細菌內毒素、殘餘 DNA、唾液酸含量、 γ 羧化百分比、帶電荷的 N 型醣鏈、殘留的濾出親和性配位體、及生物負荷。

【0569】 陰離子交換層析（步驟 12）

【0570】 用陰離子交換樹脂填充之管柱係用於此步驟。該管柱係經填充至一預定義之柱床高度。裝填物為經濃縮滲濾之 HIC 溶析物流份。FVII 至 FVIIa 的活化係於陰離子交換管柱中發生。在活化和一個洗滌步驟之後，產物係經溶析及採集供進一步處理。必要時溶析物係經調整 pH。接著使溶析物通過 0.45/0.2 μm 過濾器過濾。將材料在 2-8°C 下儲存直至進一步處理。所有層析步驟均以流向下的模式進行。藉由在 280 nm 下的吸光度、RP-HPLC、AIEX HPLC、SEC-HPLC、HCP ELISA、SDS-PAGE 及西方墨

點法來測試溶析物之特定蛋白濃度、殘餘 DNA 及生物負荷。

【0571】 藉由奈米過濾進行病毒的移除(步驟 13)

【0572】 病毒的移除係使用 Asahi Planova 20N 病毒過濾器來執行。將具有 0.45 / 0.2 μm 或 0.1 μm 薄膜之過濾器使用作奈米過濾器(Planova 20N filter)之預濾器。將 Asahi Planova 20N 病毒過濾器係經預先平衡且用以調配物緩衝液製得之陰離子交換溶析緩衝液灌注。陰離子交換溶析物在連續壓力下通過過濾器系列且採集在無菌生物處理袋中。過濾器系列(planova 過濾器)係以陰離子交換溶析物緩衝液或調配物緩衝液沖洗以使產物回收率達至最大。過濾器在使用前後按照製造商推薦之程式進行完整性測試使用後測試包含金粒子測試，亦按照製造商之程式。藉由在 280 nm 下的吸光度、RP-HPLC、AIEX HPLC、SEC-HPLC 及 SDS-PAGE 來測試病毒濾液之特定蛋白。同樣地，測試病毒濾液的細菌內毒素及生物負荷。

【0573】 原料藥(DS)之 UFDF3 及過濾及儲存(步驟 14)

【0574】 將病毒濾液濃縮至製備物中目標 DS 濃度(其可在 2-100 mg/ml 之範圍內變化)以便整批過濾及填充。最後一步驟包含通過 0.2 μm 過濾器的無菌過濾來進行過濾。截留 3-30 KDa 之單次使用或可重複使用的卡匣係用於此步驟中。將產物在第一步驟中濃縮至 5-25 mg/ml 的蛋白，且在 20 mM 檸檬酸、150 mM NaCl、13.3mM 甘胺酸及 pH 6.4 中或在 20mM 檸檬酸、100mM 精胺酸、2%海藻糖及 pH 6.2 (≥ 7 DF 體積)中滲濾。藉由在 280 nm 下的吸光度來測試 UFDF-3 彙集液物之特定蛋白。同樣地，測試 UFDF-3 彙集液的細菌內毒素及生物負荷。

【0575】 調整最終產物濃度，且添加聚山梨醇酯-80 (PS-80)以調整到 0.04%的最終濃度。或者，不進行添加。用 Millipak 100 或 Millipak 200 過濾器對經調整的 UFDF-3 產物進行過濾。將經過濾之產物溶液等分，且冷凍在 70 ± 5 °C 的溫度下。用 A280 測試經調配之彙集液之產物濃度。調配物緩衝液為 pH 6.2 之 20 mM 檸檬酸、100mM 精胺酸、2%海藻糖與 0.04%

PS80。

【0576】 結果

【0577】 所使用的純化製程係於複合模式步驟（圖 21）期間擷取並純化該高度 γ 羧化的 MOD-5014，及高度醣基化的 MOD-5014 產物。再者，高度醣基化的 MOD-5014 之初始百分比係受到上游細胞培養過程的影響並在整個純化製程中保持恆定（圖 19）。該製程在複合模式與 HIC 純化步驟（圖 20）期間顯示出對於去除相關雜質（諸如氧化形式及其他相關形式）之高度能力，並產生高質量的產物。

【0578】 經純化 MOD-5014 產物的減縮 SDS-PAGE 分析係顯示於圖 18。以下的分離產物係經識別（見右邊的編號）：75kDa – 非活化形式的 MOD-5014 (1)；55kDa – MOD-5014 重鏈-CTP-CTP-CTP (2)；25kDa – MOD-5014 輕鏈(4)；低分子量(LMW)形式(3, 5 及 6)。

【0579】 表 9 係顯示生產製程結果在兩個不同的委外生產服務(CMO)中之工程運行(ER)及不同 GMP 運行（良好作業規範）。細節包含效價、非活化的 MOD-5014 百分比(%)、氧化形式的百分比(%)、未羧化之麩胺酸殘基（缺少 Gla 的結構域）百分比(%)、唾液酸含量(mol/mol)及 O 型醣鏈含量(mol/mol)。

表 9：經純化的 MOD-5014 之品質屬性

方法	CMO-1		CMO-2	
	ER	GMP1	GMP1	GMP2
效價 (U/mg)	15,563	16,720	22,478	23,608
未經活化的 FVII	2.7	2.4	2.6	3.0
氧化形式 (%)	4.0	4.9	2.9	3.9
缺少 Gla 的結構域 (%)	5.4	5.5	0.6	0.6
唾液酸 (mol/mol)	17.1	17.1	18.4	17.2
O 型醣鏈 (mol/mol)	12.3	13.2	13.2	12.5

【0580】 此外，CMO-1 的結果顯示出帶電荷的 N 型醣鏈百分比為 85.3(ER)及 84.2 (GMP1)。

【0581】 結論

【0582】 總而言之，已開發了適於支援臨床開發和商業製造之大規模的批次饋料製造流程。其結果支援此製程成為一個可重現之生產高度醣基化長效型 FVIIa-CTP (MOD-5014)的批次饋料製造流程。經純化的 MOD-5014 產物係具有高含量程度的 O 型醣鏈及唾液酸。經純化的產物具有最小程度的非活化 FVII 及缺少 Gla 的結構域（未羧化的 Glu 殘基）。

實例 4

藥品(DP)製造

【0583】 調配藥品(DP)製程開始於解凍原料藥(DS)。藥品藉由以下方式獲得：使用調配物緩衝液將原料藥(DS)稀釋至所需濃度或者在不稀釋的情況下進行填充，無菌過濾且填充在標準 2R 小瓶或其他初步包裝(諸如濾筒或預填注射器)中。熟習此項技術者將瞭解，術語「原料藥」(DS)可涵蓋或相當於活性醫藥成分(API)。在一個實施例中，如本文所闡述之 CTP 修飾的因子 VII 為包括大量經純化藥物之原料藥(DS)。熟習此項技術者亦將瞭

解，術語「藥品」(DP)可涵蓋在無菌條件下分配至最終容器(例如小瓶)中後的經最終調配的藥物。在一個實施例中，如本文所闡述之 CTP 修飾的因子 VII 為包括經最終調配和 CTP 修飾的因子 VII 之藥品(DP)。

【0584】 CTP 修飾的因子 VII 之定性

【0585】 採集液中之 CTP 修飾的多肽含量及經高度醣基化形式之百分比藉由特定 RP-HPLC 方法測定。採集液中之總蛋白藉由布萊德福分析測定。由所選擇植株生產之採集液中的特定蛋白百分比相對於採集液中之總蛋白高於 70%。另外，發展製造上游製程，以實現與經低醣基化形式相比高比例的經高度醣基化的 CTP 修飾的蛋白質。經高度醣基化的形式為目標形式，因為其引起 CTP 修飾的多肽半衰期之較長延長。

【0586】 O 型醣鏈含量

【0587】 醣基化剖析藉由以下方式執行：釋放聚醣，之後用 2-胺基苯甲醯胺(2AB)進行聚醣標記，清洗且藉由 NP-HPLC 分析。簡言之，進行 O 型醣鏈含量分析以計算每莫耳之 CTP 修飾的因子 VII 中之 O 型醣鏈的莫耳數。O 型醣鏈之末端半乳糖單元係藉由 β -半乳糖苷酶以酶促方式自該蛋白質裂解。此等遊離半乳糖單元係在 CarboPac PA20 管柱上分離且用脈衝式電流測定法偵測。半乳糖(Gal)係使用外部校準用半乳糖參考標準來定量。半乳糖含量可為與 O 型醣鏈結構 Gal-GalNAc 之含量直接相關。原料藥及藥品批次之分析展現穩健的批次與批次一致性。此出人意料的穩健醣基化含量為顯著的，展示出相比於本領域中已知的，每個 CTP 之 O 型醣鏈數目得以改進。

【0588】 完整分子量分析樣本

【0589】 進行不同 DS 批次之分子量分析，其目的在於獲得關於 O 鍵聯的醣基化位點數目之資訊。完整樣本以及使用神經醯胺酶脫唾液酸化之樣本及使用 O-糖苷酶脫 O-醣基化之樣本藉由線上 LC/ES-MS 分析。結果展示出，絲胺酸佔有率%與本領域中已知的程度相比出人意料地高(與本文中

製造的 CTP 修飾的因子 VII 中之高達 6 個相比，僅 4 個絲胺酸經醯基化)。

【0590】 CTP 修飾的蛋白質樣本之 O 鍵聯醯基化位點佔有率

【0591】 4 個不同 DS 批次之 O-醯基化位點佔有率在 M 掃描下進行，其旨在獲得關於每個分子 O 鍵聯的醯基化位點數目之資訊。樣本使用神經醯胺酶脫唾液酸化，之後對經還原/羧甲基化樣本進行胰蛋白酶消化。最終，對經處理樣本進行線上 LC/ES-MS，且使用指定軟體進行對 MS 資料之解釋。對獲自胰蛋白酶消化混合物之分析之資料的評估產生允許映射 100% 蛋白質序列之信號。O-醯基化可在 N 端及 C 端 CTP 區兩者上進行。佔有之位點鑑別為在脯胺酸之後的絲胺酸殘基以及在絲胺酸重複序列區中的四個絲胺酸中之兩個。總共至多 18 個絲胺酸殘基可用作 O 型醯鏈之連接位點。偵測到批次之間無顯著差異。

【0592】 純度

【0593】 RP-HPLC 根據分子的極性分離分子。自較大極性至較小極性溶劑之移動相梯度用於使極性較強的分子先於極性較小的分子溶析。相關形式使用在 220nm 下之 UV 偵測與原生蛋白分離。相關形式及主峰之相對峰面積(面積%)可藉由對相應峰面積進行積分來計算。原料藥及藥品之主峰由超過 97%峰面積組成，指示高度純化產物及有效純化製程。

【0594】 尺寸排阻 HPLC 為根據大小分離分子之層析技術。在所選擇之流份範圍中，較大分子先於較小分子溶析。分離機制為非吸附的，且分子在等度條件下溶析。SEC 允許目標分子之單體與較高分子量形式(諸如二聚物及聚合物)分離。發展 SEC 方法以分析原料藥及藥品中二聚物及聚合物之含量。

【0595】 RP-HPLC 含量方法

【0596】 此方法正用於中間體樣本之含量測定以及中間體樣本中未醯基化 CTP 修飾的多肽%-測定，其利用逆相層析法進行。逆相 HPLC 因分子的極性而分離分子。相對非極性分子接合至管柱材料，而帶電荷的及極性

分子在不實現與管柱之相互作用的情況下溶析。

【0597】 接合之分子藉助於自極性至較小極性溶液之梯度溶析。最強極性之分子首先溶析，之後為極性小於分子。偵測經由在 214nm 下吸收進行。

【0598】 病毒清除率

【0599】 製造製程解決及減低具有內源及外源病毒之最終藥品之污染的能力已為初步評估之主題。GLP 相容研究已根據可適用指導進行，用於研究性產物，使用三種外加至製造製程之按比例縮小段中之模型病毒，以定量此等步驟去活化或清除外加病毒群體之能力。在表示為 $\log_{10}$ 調節滴定度之病毒量的情況下， $\log_{10}$ 清除率因子僅僅藉由將輸出值減去輸入值來測定。作為 $\log_{10}$ 數值，加上清除率因子以推導所有評估步驟之整體清除率因子。A-MuLV 視為表示可能存在的 CHO 逆轉錄病毒之模型病毒，去活化及移除污染性 A-MuLV 病毒所需之量測獲得至少 antilog_{10} 之清除率因子，例如病毒對數下降因子(LRF)為約 22，展示出整個製程具有優越的移除病毒的能力。對於作為耐藥性非包膜小病毒之 PPV，藉由奈米過濾步驟獲得穩健移除。

【0600】 儘管已在本文中說明及描述本文揭示之某些特徵，但本領域中普通技術人員現將想到多種修改、替代、變化及等效物。因此，應理解，所附申請專利範圍意欲涵蓋如屬於本文揭示之真實精神內的所有此類修改及變化。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 歐科生物製品有限公司(OPKO BIOLOGICS LTD.)

<120> 長效型凝血因子及其生產方法

<130> P-9520-PC9

<140> TW 106123247

<141> 2017-07-11

<150> US 62/360,767

<151> 2016-07-11

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1356

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ctcgaggaca tggctcicca ggccctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc	60
tgccctggctg cagtcttcgt aaccagggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180
gagcagtgtc ctttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgic ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acggggtgtc ctgcacacc acagttgaat atccatgttg aaaaatacct	540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc	600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat	780

I850192

gagcagagcc ggcggggtggc gcagggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tctcactga ccatgtggtg	900
ccccctctgcc tgcccgaacg gacgtttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca	960
ttggtcagcg gctgggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac	1080
tccccaata tcacggagta catgtttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacg	1200
ggcatcgtca gctgggggcca gggctgcgca accgtggggc actttggggt gtacaccagg	1260
gtctccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct cagagccacg cccaggagtc	1320
ctcttgcgag ccccatttcc ctgaggatgc ggccgc	1356

<210>	2
<211>	444
<212>	PRT
<213>	智人

 $\langle 400 \rangle$ 2

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

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

85															90															95																													
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro																																												
100															105															110																													
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile																																												
115															120															125																													
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr																																												
130															135															140																													
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala																																												
145															150															155															160														
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile																																												
165															170															175																													
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val																																												
180															185															190																													
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu																																												
195															200															205																													
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile																																												
210															215															220																													
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg																																												
225															230															235															240														
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly																																												
245															250															255																													
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr																																												
260															265															270																													
Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln																																												
275															280															285																													

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 3
<211> 448
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg
435 440 445

<210> 4
<211> 1621
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的因子VII

<400> 4	
ctcgaggaca tggctccca ggccctcagg ctccctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc	60
tgcctggctg cagtcttcgt aaccagggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg cgttccttga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180
gagcagtgtc ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tcctgcctt cgagggccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct	480
ctgtctggcag acggggtgtc ctgcacacc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct	540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc	600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggctctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg	660
gggacctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat	780
gagcagagcc ggcggtggc gcaggctatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgtgtct ccgctgcac cagcccgtgg tctcactga ccatgtggtg	900
ccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgtttctca	960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac	1080
tccccaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc	1200
ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg	1260
gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg	1320
ctgttgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc	1380
cctagcagac tgccctgggcc cagtgcaccc cctatcctgc ctcagtcag ctccagcaag	1440
gccccacccc ctaggctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt	1500
ctgccccagt cctccagcag taaggtcccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg	1560
ccaggccctt ctgatacacc cctctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta	1620
a	1621

<210> 5
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的因子VII

<400> 5

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln	
1 5 10 15	
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val	
20 25 30	
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro	
35 40 45	
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu	
50 55 60	

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser
435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
485 490 495

Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
500 505 510

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
515 520 525

<210> 6
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 訊息序列

<400> 6

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

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg
35

<210> 7
<211> 490
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的因子VII

<400> 7

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
		100						105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
			165					170						175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
		180						185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
	195						200					205			

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
405 410 415

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
420 425 430

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
435 440 445

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser
450 455 460

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
485 490

<210> 8
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的因子VII - 輕鏈

<400> 8

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg
145 150

<210> 9
<211> 338
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的因子VII - 重鏈

<400> 9

Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn
20 25 30

Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn
35 40 45

Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His
50 55 60

Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser
65					70					75					80
Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu
				85					90					95	
His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro
			100					105					110		
Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu
		115						120				125			
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu
		130					135					140			
Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln
145					150					155					160
Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe
				165					170					175	
Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser
			180					185					190		
Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly
		195						200				205			
Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val
		210					215				220				
Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg
225					230					235					240
Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro	Ser	Ser
				245					250					255	
Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro
			260					265					270		

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala
275 280 285

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
290 295 300

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
305 310 315 320

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
325 330 335

Pro Gln

<210> 10
<211> 2413
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10	
tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca	60
ggaaccttgg tcttctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg	120
gctgtgcgca tccctggagg ccagcggtg gccaacagtg tggcacgga gcatgggttc	180
ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccattct ggcatcgagg agtgacgaag	240
cggtcctgt cgcctaccg ccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag	300
tggtggaac agcaggtggc aaagcgacg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca	360
gaccccaagt ttctcagca gtggtacctg tctggtgtca ctcagcggga cctgaatgtg	420
aaggcggcct gggcgagg ctacacagg cacggcattg tggctccat tctggacgat	480
ggcatcgaga agaaccaccc ggacttgga ggcaattatg atcctggggc cagttttgat	540
gtcaatgacc aggacctga ccccgacct cgttacacac agatgaatga caacaggcac	600
ggcacacggt gtgcggggga agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tgggttaggt	660

gtggcctaca acgccccgat tggaggggtg cgcattgctgg atggcgaggt gacagatgca	720
gtggaggcac gctcgtctggg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg	780
ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcggcga ggaggccttc	840
ttccgtgggg ttagccaggg ccgagggggg ctgggctcca tctttgtctg ggccctgggg	900
aacggggggc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacag	960
ctgtccatca gcagcgccac gcagtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggccctgctcg	1020
tccacactgg ccacgacctc cagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact	1080
gacttgccgc agaagtgcac ggagtctcac acggggcacct cagcctctgc ccccttagca	1140
gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa	1200
cacctggtgg tacagacctc gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat	1260
ggtgtgggcc ggaaagtgag ccactcatat ggctacgggc ttttggacgc aggcgccatg	1320
gtggccctgg ccagaaattg gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcatt catcgacatc	1380
ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggctg ggaagaccgt gaccgcgtgc	1440
ctgggcgagc ccaaccacat cactcggtctg gagcacgtc aggcgcggct caccctgtcc	1500
tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggctagcc ccatgggcac ccgtccacc	1560
ctgtctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggcccttcatt	1620
acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggt tcctagagat tgaaaacacc	1680
agcgaagcca acaactatgg gacgtgacc aagttcacc tcgtactcta tggcaccgcc	1740
cctgaggggc tgcccgatcc tccagaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagttag	1800
gcctgtgtgg tgtgcgagga aggtttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc	1860
cctccaggct tcgcccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag	1920
accatccggg ccagcgtctg cgcacctgac cagcctcat gtgccacatg ccaggggccg	1980
gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cagcctcct tggaccctgt ggagcagact	2040
tgctccccgc aaagccagag cagccgagag tccccccac agcagcagcc acctcggtg	2100
cccccgagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgccctc acacctgcct	2160

gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttctg

2220

gtcctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cgggggggtga aggtgtacac catggaccgt

2280

ggcctcatct cctacaagg gctgccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac

2340

tcagaagagg acgagggccg gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgccctc

2400

tgaacgcggc cgc

2413

<210> 11

<211> 793

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn

20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val

35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr

50 55 60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His

65 70 75 80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu

85 90 95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu

100 105 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr

115 120 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
130 135 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
145 150 155 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
165 170 175

Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
180 185 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
195 200 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
210 215 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
225 230 235 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
245 250 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
260 265 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
275 280 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
290 295 300

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
305 310 315 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
325 330 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
340 345 350

Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
355 360 365

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
370 375 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
405 410 415

Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
435 440 445

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
450 455 460

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
465 470 475 480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
515 520 525

Asn	Asp	Trp	Ala	Phe	Met	Thr	Thr	His	Ser	Trp	Asp	Glu	Asp	Pro	Ser	
530						535					540					
Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Glu	Ile	Glu	Asn	Thr	Ser	Glu	Ala	Asn	Asn	Tyr	
545					550					555					560	
Gly	Thr	Leu	Thr	Lys	Phe	Thr	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Thr	Ala	Pro	Glu	
				565						570					575	
Gly	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Ser	Ser	Gly	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Ser	
			580						585						590	
Ser	Gln	Ala	Cys	Val	Val	Cys	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	His	Gln	Lys	
			595						600					605		
Ser	Cys	Val	Gln	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Asp	
			610					615						620		
Thr	His	Tyr	Ser	Thr	Glu	Asn	Asp	Val	Glu	Thr	Ile	Arg	Ala	Ser	Val	
625					630						635				640	
Cys	Ala	Pro	Cys	His	Ala	Ser	Cys	Ala	Thr	Cys	Gln	Gly	Pro	Ala	Leu	
				645							650				655	
Thr	Asp	Cys	Leu	Ser	Cys	Pro	Ser	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Val	Glu	
			660								665				670	
Gln	Thr	Cys	Ser	Arg	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Pro	Gln	
			675										680		685	
Gln	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	
			690										695		700	
Arg	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Ser	His	Leu	Pro	Glu	Val	Val	Ala	Gly	Leu	
705								710					715			720
Ser	Cys	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Val	Phe	Val	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Leu	
				725									730			735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met
740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln
755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg
770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala
785 790

<210> 12
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

<210> 13
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 14
<211> 12

I850192

<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

申請專利範圍

1. 一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：

- a. 由至少 15 mol/mol 組成之高唾液酸含量；
- b. 包括至少 10 mol/mol 的 O 型醣鏈含量之高度醣基化形式；
- c. 由少於 5%氧化形式所組成之低度氧化形式；
- d. 由至少 90%的羧化麩胺酸(Gla)殘基所組成之高比例的羧化麩胺酸殘基；
- e. 至少 60%帶電荷的 N 型醣鏈；及
- f. 至少 10,500 U/mg 的效價；且

其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之胺基酸序列係由 SEQ ID NO: 7 中所載的胺基酸序列所組成。

2. 如請求項 1 之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽，

其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽的胺基酸序列在結構上係呈現為雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體，其包括介於 SEQ ID NO: 7 之半胱胺酸殘基 135 與半胱胺酸殘基 262 之間的雙硫(S-S)鍵，且其中該雙鏈係包括含有 SEQ ID NO: 7 之第 1-152 個胺基酸的輕鏈以及含有 SEQ ID NO: 7 之第 153-490 個胺基酸的重鏈。

3. 如請求項 1 至 2 中任一項之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽，其中

- a. 該帶電荷的 N 型醣鏈之比例係選自由 85.3%與 84.2%所組成之群；

- b. 該效價係選自由以下組成之群：15,563 U/mg、16,720 U/mg、22,478 U/mg 及 23,608 U/mg；
 - c. 該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽具有每個 CTP 至少 4 個 O 鍵聯的醣基化位點；
或其任何組合。
4. 如請求項 1 至 2 中任一項之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽，其中
- a. 該實質純質及活性形式係包括至少 60% 之高度醣基化形式之羧化麩胺酸(Gla)殘基之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽；
 - b. 該實質純質與活性形式之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之純度為至少 90%，或係選自 97.3%、97.6%、97.4% 及 97.0%；
或其任何組合。
5. 一種製造人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽之方法，其中該多肽係包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，該方法包括以下步驟：
- I. 穩定地轉染表現載體至預定數量的細胞，該表現載體包括編碼該 CTP 修飾的 FVII 多肽之編碼部分，
其中該經轉染的細胞係表現並分泌該 CTP 修飾的 FVII 多肽；
 - II. 取得過度表現該 CTP 修飾的 FVII 多肽之細胞選植株(clone)；
 - III. 在溶液中擴增該等細胞選植株至一預定規模；
 - IV. 採集該含有細胞選植株之溶液；
 - V. 過濾該含有細胞選植株之溶液以取得含有該 CTP 修飾的 FVII 多肽之澄清採集溶液；以及

- VI. 從該澄清採集溶液純化並活化該 CTP 修飾的 FVII 多肽，以取得具有期望濃度之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之純化蛋白溶液，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係包括以下：
- 由少於 5% 氧化形式所組成之低度氧化形式；
 - 由至少 90% 的羧化麩胺酸(Glu)殘基所組成之高比例的羧化麩胺酸殘基；
 - 至少 60% 帶電荷的 N 型糖鏈；及
 - 至少 10,500 U/mg 的效價；
- 藉以製造 CTP 修飾的 FVIIa 多肽，且其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽的胺基酸序列係如 SEQ ID NO: 7 所載。
6. 如請求項 5 之方法，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之純度為至少 90%，或係選自 97.3%、97.6%、97.4% 及 97.0%。
7. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中
- 該擴增步驟係包括擴增取自工作細胞庫(working cell bank, WCB)之選植株，其視情況地表現並分泌該 CTP 修飾的 FVII 多肽，或其中該擴增步驟係包括擴增取自主細胞庫(master cell bank, MCB)之選植株，其視情況地表現並分泌該 CTP 修飾的 FVII 多肽；
 - 該製造方法為無動物的製程；
 - 該選植株係以至少 40 mg/L 的含量表現並分泌 CTP 修飾的 FVII 多肽；
 - 該選植株係通過一系列的繼代培養步驟來達到生物反應器程度而在溶液中擴增；
 - 病毒清除率係顯示約 22 的病毒對數下降因子(LRF)；或其任何組合。

8. 如請求項 7 之方法，其中該生物反應器包括拋棄式生物反應器或不銹鋼生物反應器，或其中該生物反應器係以做為批次饋料模式的生物反應器而運行。
9. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中該澄清採集液的純化係包括執行以下步驟，其包括：

依序使該澄清採集溶液通過親和性管柱、複合模式或混合模式管柱、疏水性作用管柱及陰離子交換管柱，其中陰離子交換溶析液係經受超微過濾/滲濾步驟；

使存在於澄清採集液中的病毒、或者在任何該等層析管柱或其任何組合之後所收集的溶析液中的病毒去活化，其中病毒的去活化係包括在對該病毒有毒性的溶液中培養或進行奈米過濾，或其任何組合；

藉以得出經純化之 CTP 修飾的 FVII 多肽。

10. 如請求項 9 之方法，其中該病毒清除率係顯示約 22 的病毒對數下降因子(LRF)。
11. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中
 - a. 所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽為高度醣基化；
 - b. 所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括高 O 型醣鍵含量；
 - c. 所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽的醣基化模式包括每個 CTP 在至少 4 個 O 鍵聯的醣基化位點處之醣基化；或其任何組合。
12. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之醣基化模式包括每個 CTP 在至少 4 個 O 鍵聯的醣基化位點處之醣基化。
13. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中

- a. 所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽為高度唾液酸化；
 - b. 該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括由至少 15 mol/mol 所組成之唾液酸之含量；
 - c. 該高 O 型醣鏈含量包括由至少 10 mol/mol 所組成之 O 型醣鏈之含量；
 - d. 該帶電荷的 N 型醣鏈之比例係選自由 85.3%與 84.2%所組成之群；
 - e. 該效價係選自由 15,563 U/mg、16,720 U/mg、22,478 U/mg 與 23,608 U/mg 所組成之群；
 - f. 該方法達到至少 20%回收率之高度醣基化的 CTP 修飾的 FVIIa 多肽；
 - g.該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之回收率為至少 90%，或係選自 97.3%、97.6%、97.4%及 97.0%；
- 或其任何組合。
14. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中至少 60%之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係包括高度醣基化形式之羧化麩胺酸(Gla)殘基。
15. 如請求項 5 至 6 中任一項之方法，其中所製造之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽的胺基酸序列在結構上係呈現為雙硫鍵連結的雙鏈異二聚體，其包括介於 SEQ ID NO: 7 之半胱胺酸殘基 135 與半胱胺酸殘基 262 之間的雙硫(S-S)鍵，且其中該雙鏈包括含有 SEQ ID NO: 7 之第 1-152 個胺基酸的輕鏈以及含有 SEQ ID NO: 7 之第 153-490 個胺基酸的重鏈。
16. 一種人類絨毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)修飾的人類活性因子 VII (FVIIa)多肽，其包括三個以串聯方式連接至 FVIIa 的 C 端之 CTP 分子，其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係呈實質純質及活性形式，該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽包括：

- a. 由少於 5%氧化形式所組成之低度氧化形式；
- b. 由至少 90%的羧化麩胺酸(Gla)殘基所組成之高比例的羧化麩胺酸殘基；
- c. 至少 60%帶電荷的 N 型醣鏈；及
- d. 至少 10,500 U/mg 的效價；

其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽之胺基酸序列係由 SEQ ID NO: 7 中所載的胺基酸序列所組成，且其中該 CTP 修飾的 FVIIa 多肽係藉由如請求項 5 至 15 中任一項之方法所製造。

17. 一種組合物，其包括如請求項 1 至 4 及 16 中任一項之 CTP 修飾的 FVIIa 多肽，及醫藥上可接受的載體。

圖式

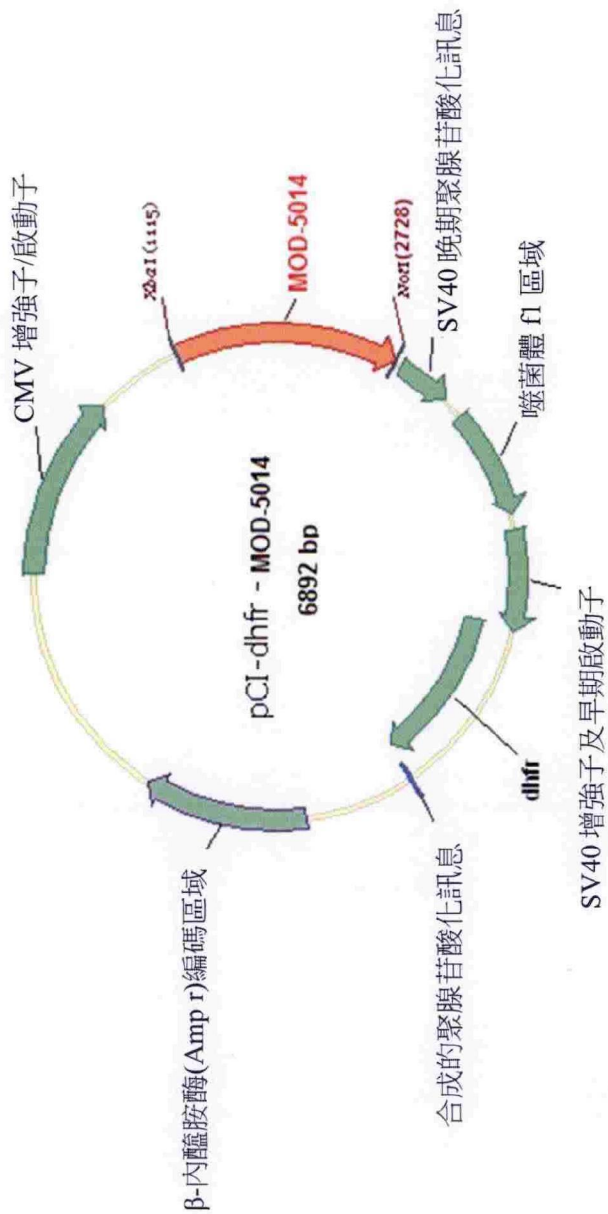


圖 1

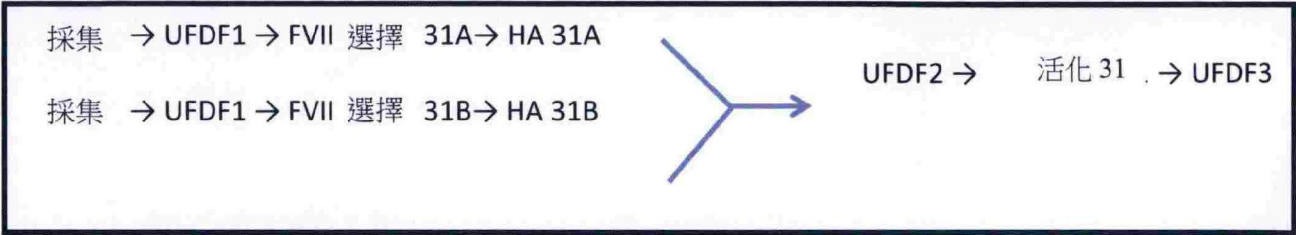


圖 2A

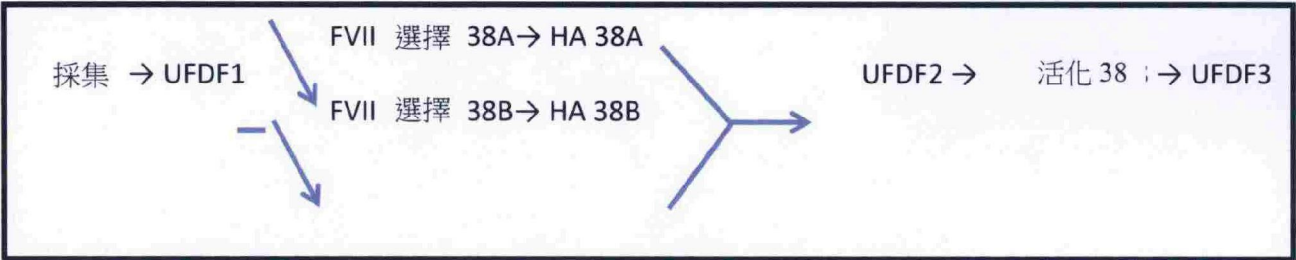


圖 2B

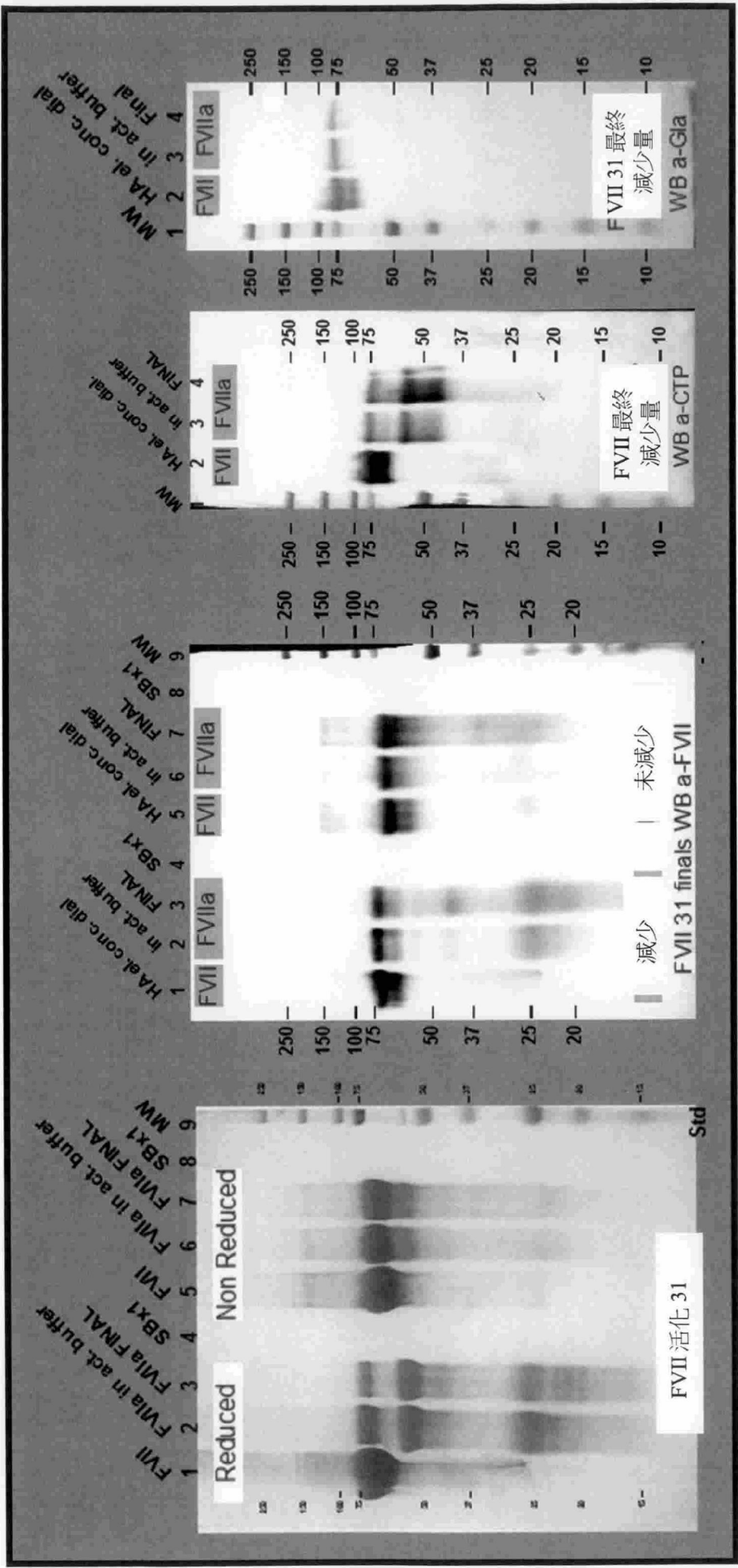


圖 3A

圖 3B

圖 3C

圖 3D

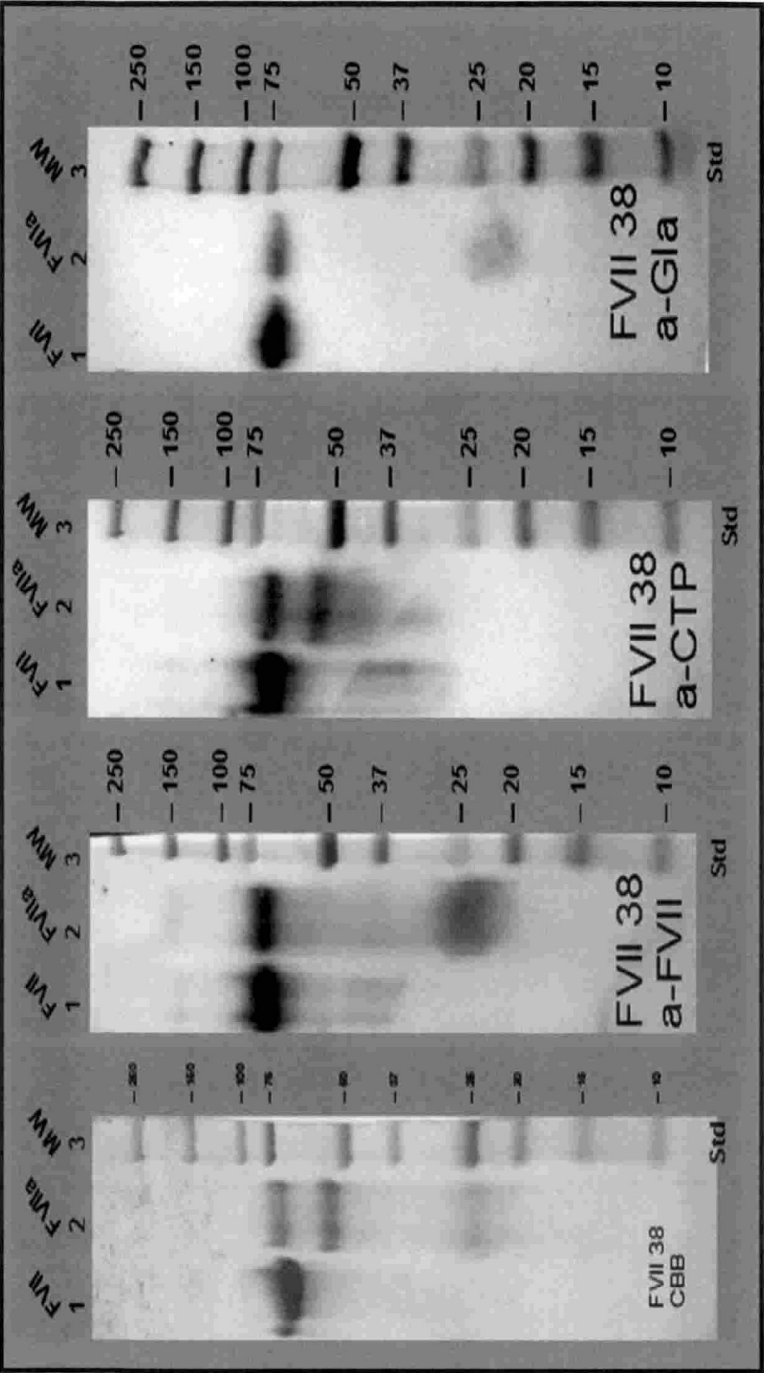


圖 3E

圖 3F

圖 3G

圖 3H

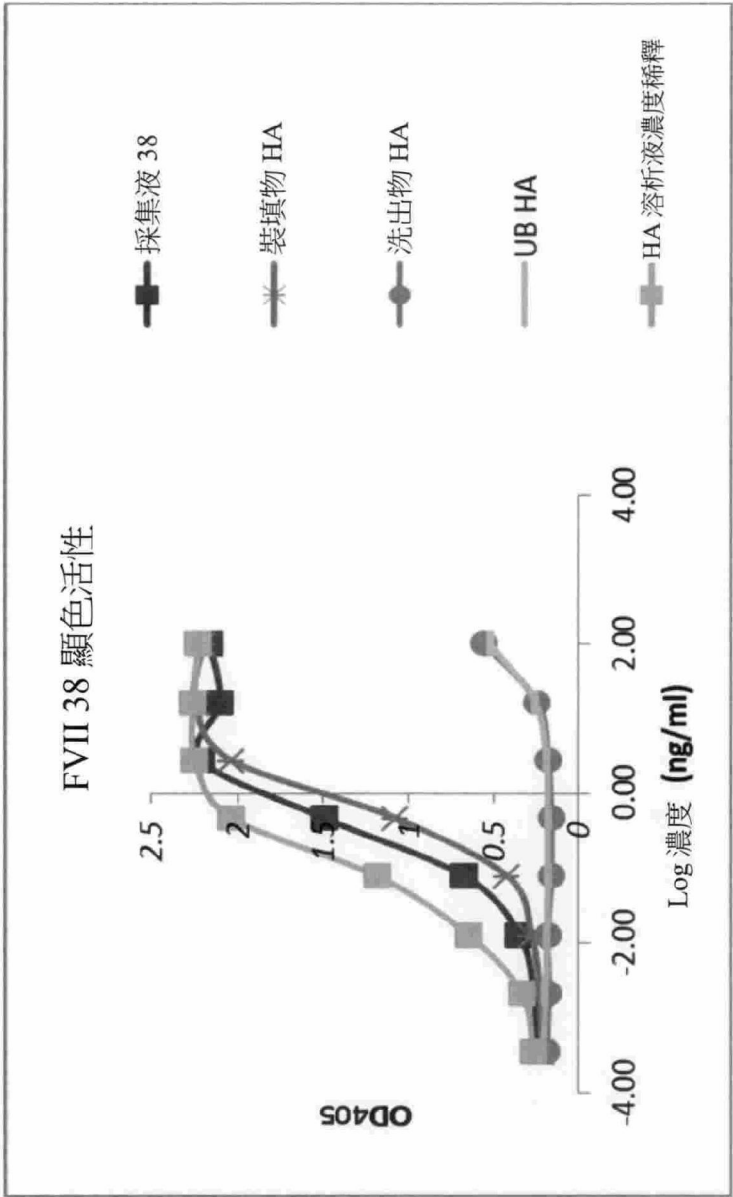


圖 4

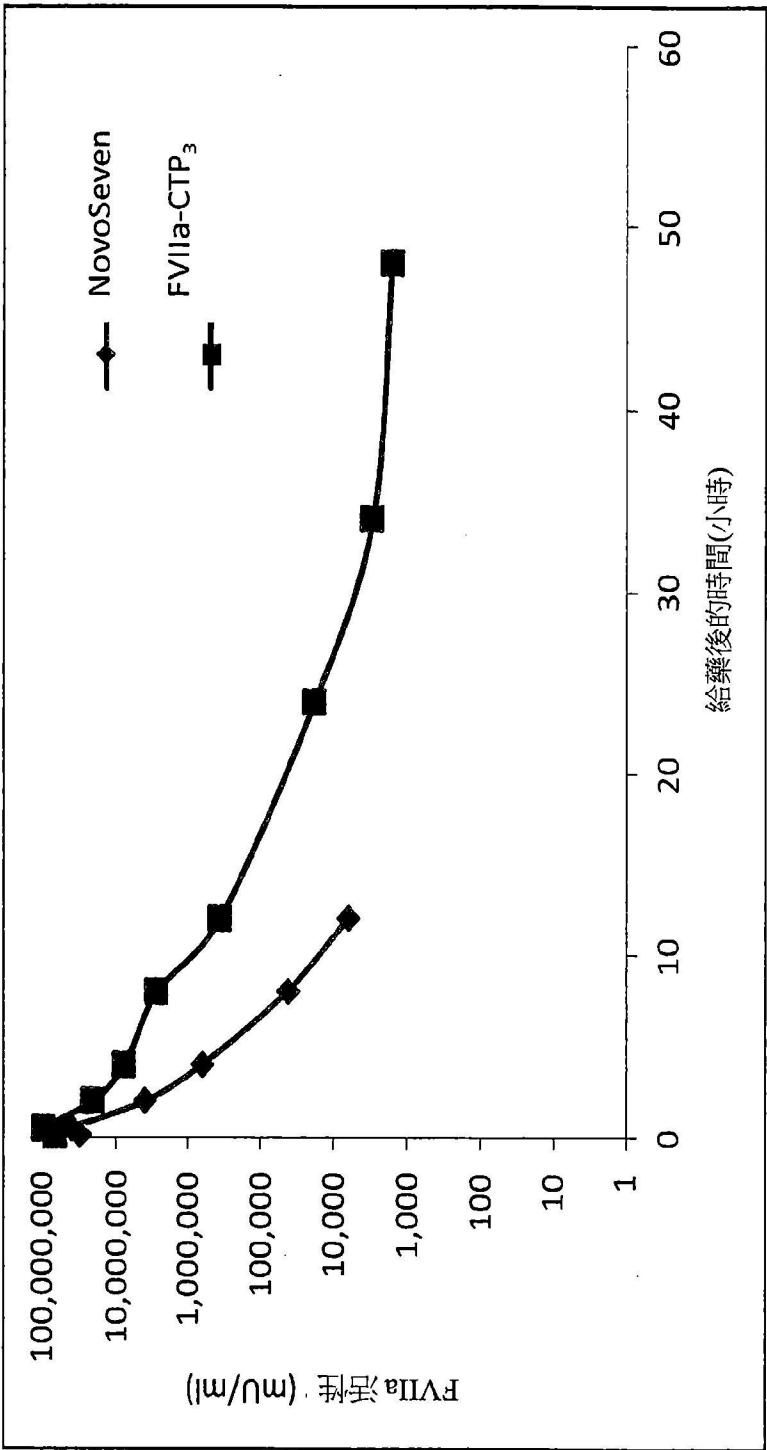


圖 5

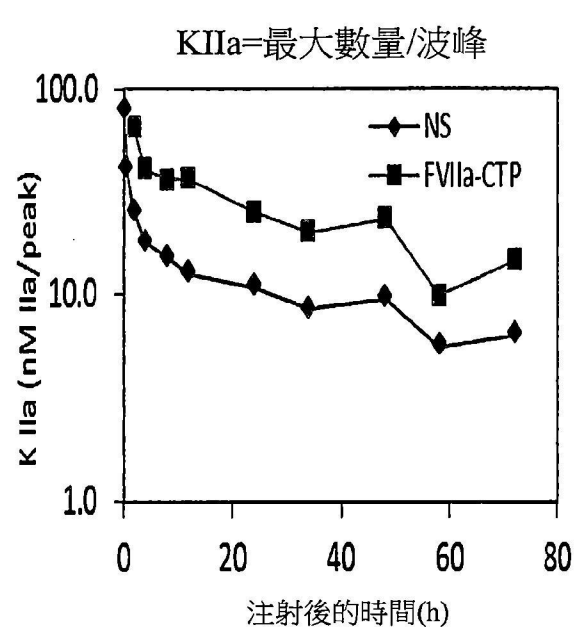


圖 6A

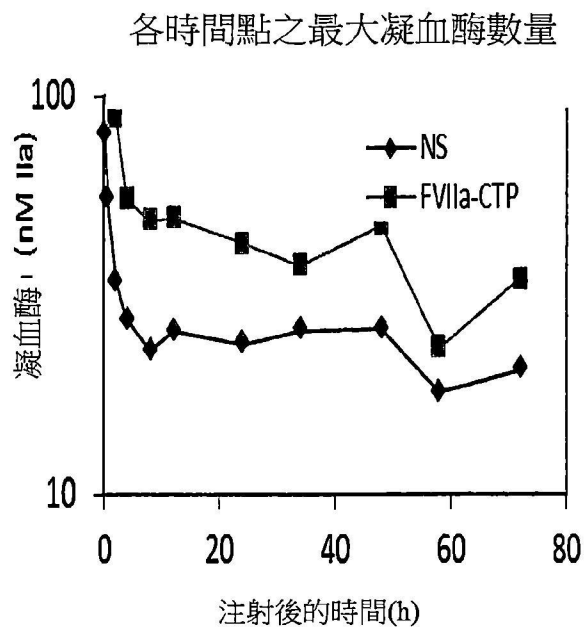


圖 6B

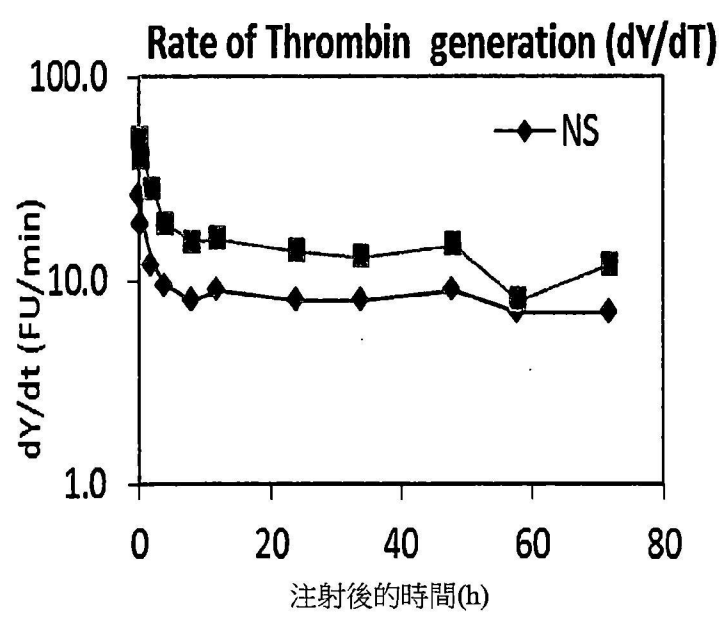


圖 6C

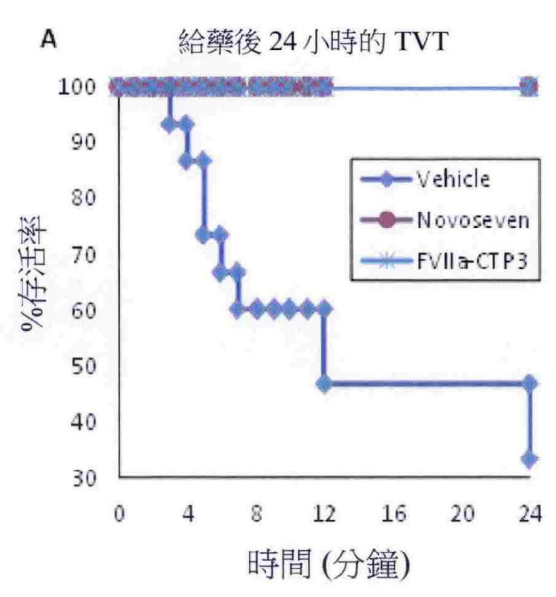


圖 7A

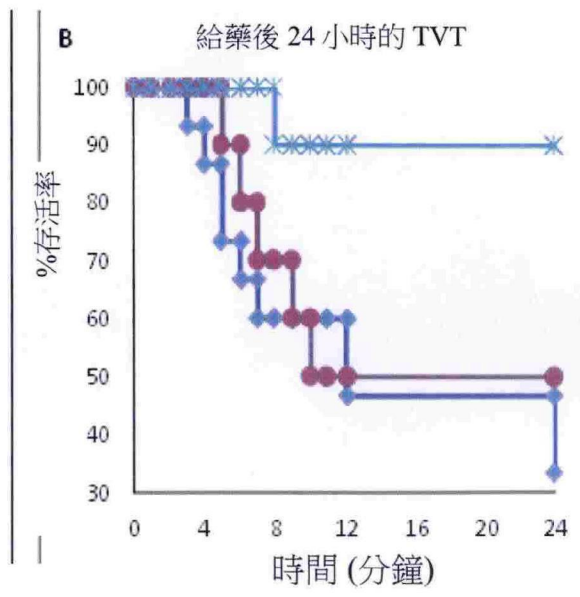


圖 7B

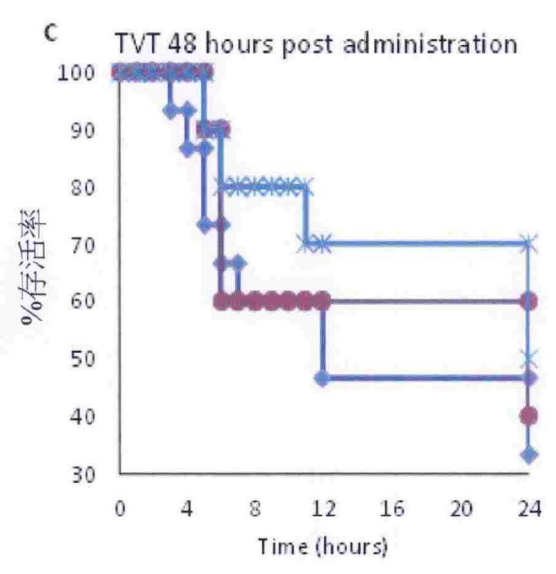


圖 7C

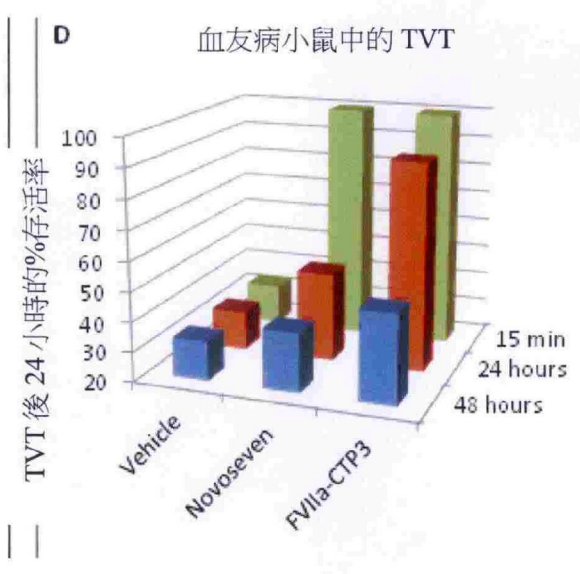


圖 7D

C206931DA.docx

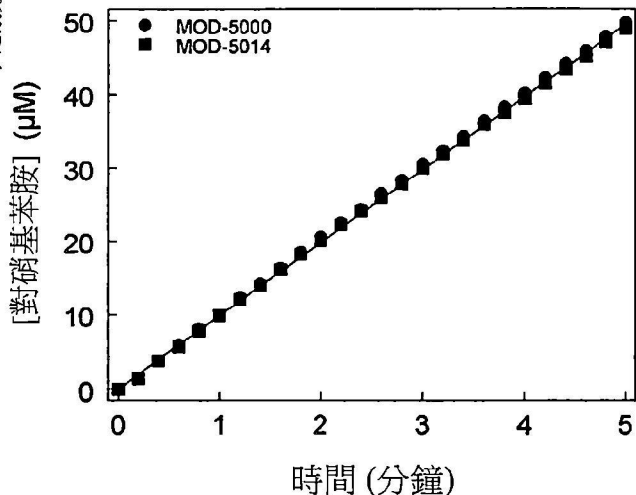


圖 8

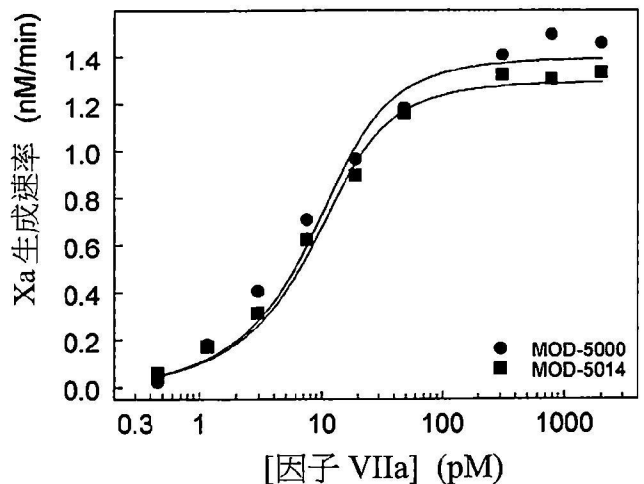


圖 10

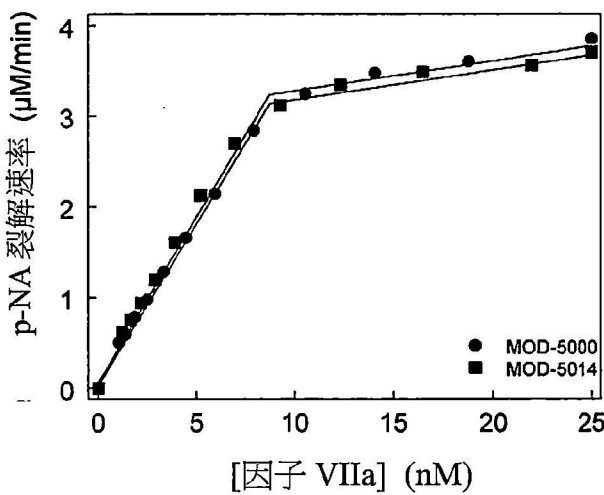


圖 9

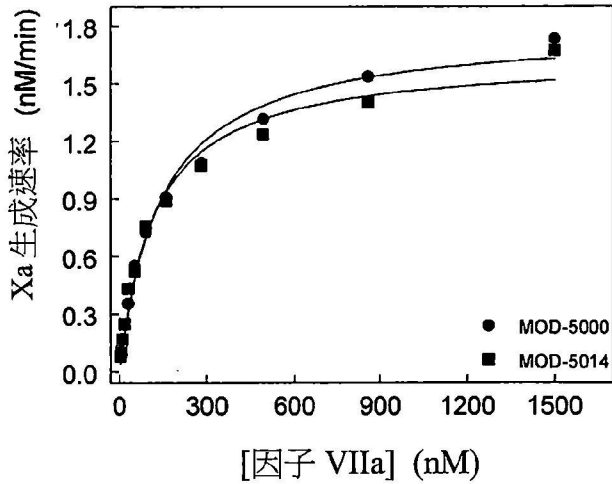


圖 11

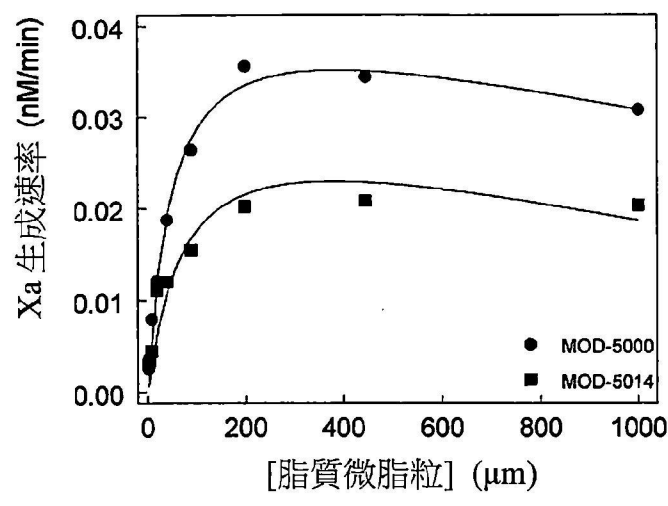


圖 12A

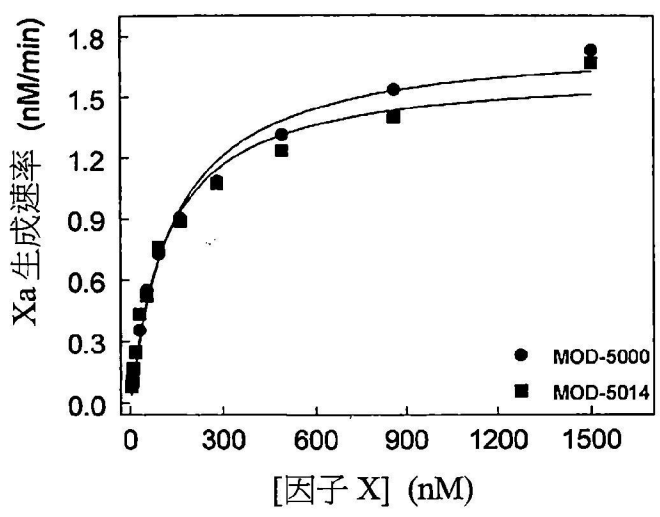


圖 13

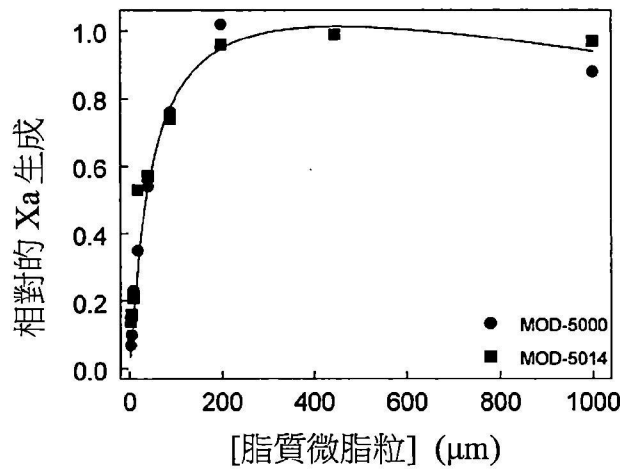


圖 12B

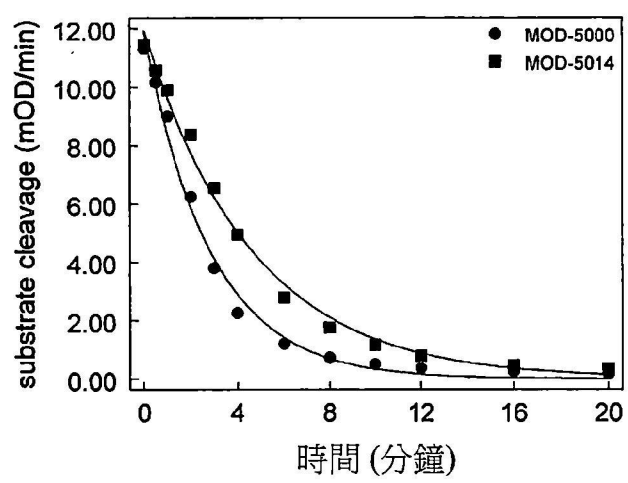


圖 14

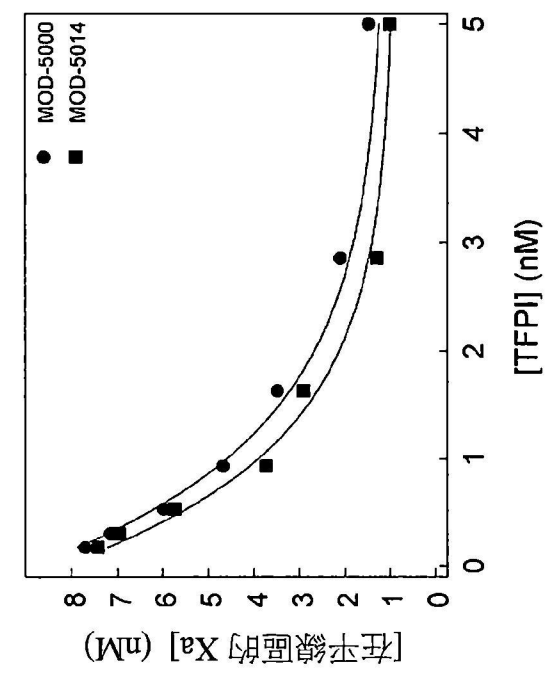


圖 15A

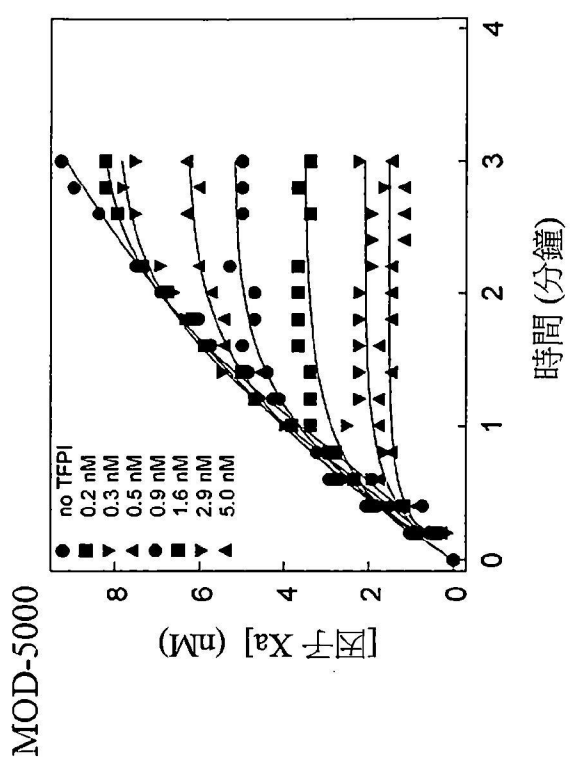


圖 15B

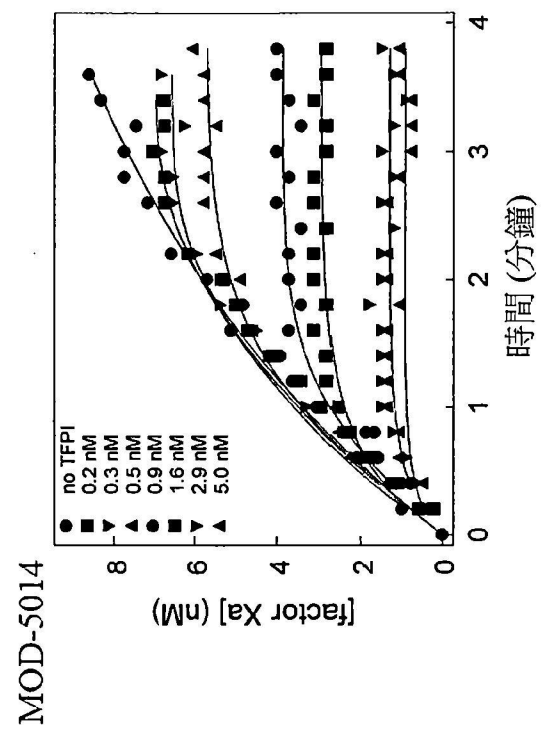


圖 15C

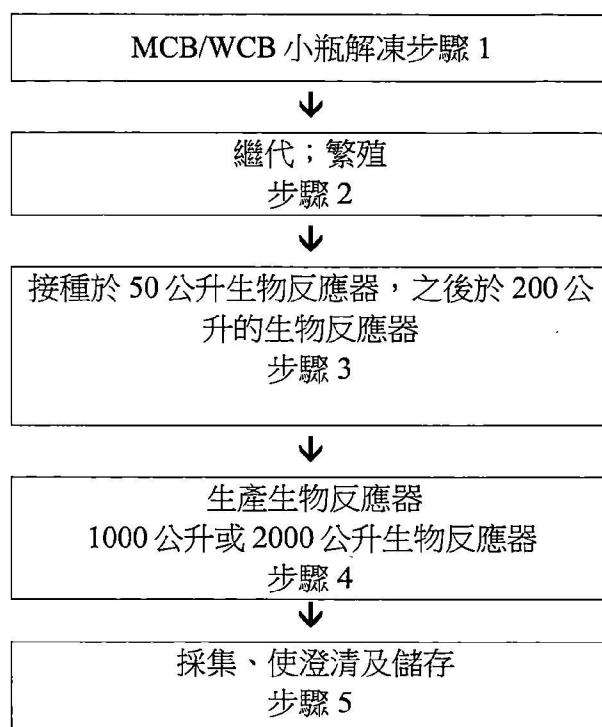


圖 16

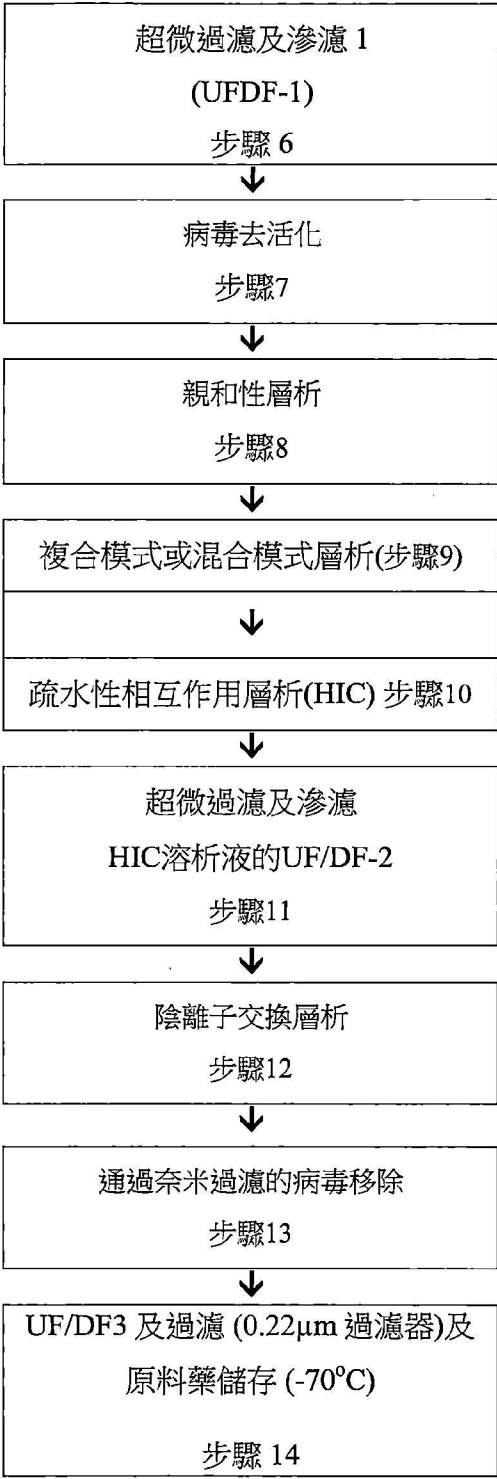


圖 17

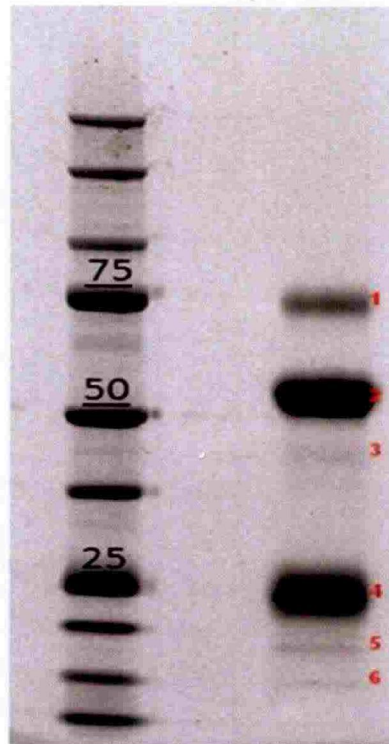


圖 18

純化步驟	帶電荷的 N 型醣鏈 (%)
採集物	NA
病毒去活化 + VII親和性層析	80.01
複合模式或混合模式層析	79.4
UF/DF2	78.5
UF/DF3	79.5

圖 19

純化步驟	RP-HPLC(%)		
	主峰	活化形式	其他相關形式
採集物	NA	NA	NA
病毒去活化 + VII 親和性層析	89.10	4.66	6.23
複合模式或混合模式 層析	91.31	4.38	4.31
疏水性相互作用層析 (HIC)	94.03	2.68	3.29
陰離子交換層析	94.69	2.48	2.83

圖 20

純化步驟	γ 羧化的 (%)
採集物	NA
病毒去活化 + VII 親和性層析	95.4
複合模式或混合模式層析	100

圖 21

純化步驟	唾液酸 (產物 mol/ mol)
採集液	NA
病毒去活化 + VII 親和性層析	15.25
CHT	16.6
UF/DF2	16.6
UF/DF3	16.4

圖 22