I779177

(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 I779177 B**

(45)公告日： 中華民國 111 (2022) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：108108839 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 03 月 15 日

(51)Int. Cl.： ***G01N27/447 (2006.01)***

(30)優先權：2018/03/19 美國 62/644,933

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

(72)發明人：瑞爾曼 堤摩西 RIEHLMAN, TIMOTHY (US)；卡瑞 蓋伯爾 CARREAU, GABRIEL (CA)；史奈德漢茲 傑夫 SCHNEIDERHEINZE, JEFF (US)；納爾 妮可 NALL, NICOLE (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

WO 99/60017A2

網路文獻 NuPAGE Technical Guide, Invitrogen, 2003.

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：1 共 20 頁

(54)名稱

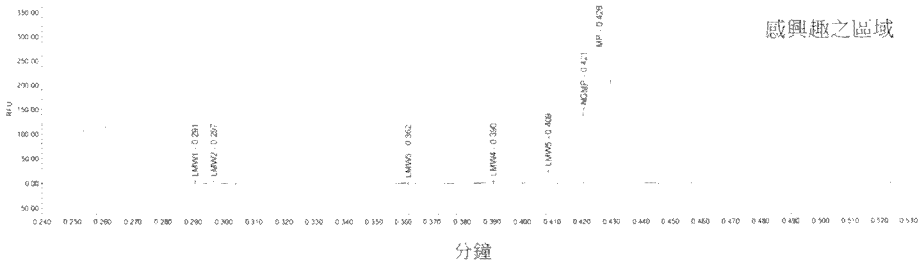
微晶片毛細管電泳分析及試劑

(57)摘要

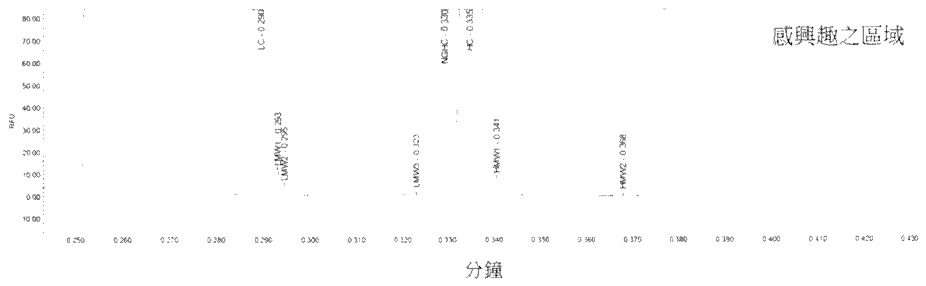
本發明提供用於評估蛋白質藥物產品樣品之純度及鑑別該蛋白質藥物產品樣品中之雜質之 MCE 分析及試劑。本發明提供用於分析蛋白質藥物樣品中之分析物之方法。

MCE assays and reagents to assess purity and to identify impurities in protein drug product samples are provided. Methods for analyzing analytes in a protein drug sample are provided.

指定代表圖：



【圖 1A】


感興趣之區域
RFU
LC - 0.260
NGHC - 0.320
HC - 0.335
LMW1 - 0.253
LMW2 - 0.295
LMW3 - 0.323
HMW1 - 0.341
HMW2 - 0.368
0.250
0.260
0.270
0.280
0.290
0.300
0.310
0.320
0.330
0.340
0.350
0.360
0.370
0.380
0.390
0.400
0.410
0.420
0.430
分鐘

【圖 1B】

I779177

【發明摘要】

【中文發明名稱】 微晶片毛細管電泳分析及試劑

【英文發明名稱】 MICROCHIP CAPILLARY ELECTROPHORESIS ASSAYS AND REAGENTS

【中文】

本發明提供用於評估蛋白質藥物產品樣品之純度及鑑別該蛋白質藥物產品樣品中之雜質之 MCE 分析及試劑。本發明提供用於分析蛋白質藥物樣品中之分析物之方法。

【英文】

MCE assays and reagents to assess purity and to identify impurities in protein drug product samples are provided. Methods for analyzing analytes in a protein drug sample are provided.

【指定代表圖】圖 1A、圖 1B。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 微晶片毛細管電泳分析及試劑

【英文發明名稱】 MICROCHIP CAPILLARY ELECTROPHORESIS ASSAYS AND REAGENTS

【技術領域】

【0001】 本發明之各態樣概言之係關於毛細管電泳之領域，特別是微晶片毛細管電泳。

【先前技術】

【0002】 實施穩健、可再現、用戶友好之技術對於滿足當今品質控制(QC)實驗室對生物產品之測試需求至關重要。技術升級係必要的，有助於提高產量，同時繼續生成高品質之分析數據，並努力儘量減少無效測試結果及儀器相關調查之數量。儘管電泳歷來用於產品純度及片段化分析之 QC，但該方法已經從基於凝膠轉變為基於毛細管，最近又轉變為微晶片。微晶片毛細管電泳(MCE)可大幅縮短樣品分析時間，同時維持 QC 分析所需之性能及再現性標準(Ouimet, C.等人，*Expert Opin Drug Discov.*, 12(2): 213-224 (2017))。

【0003】儘管 MCE 已經成為一種很有前途之技術，在製藥工業中越來越多地用於表徵生物製藥、品質控制及藥物發現，但其容易受到分析干擾。

【0004】因此，本發明之一個目的係提供改善之 MCE 分析及減少分析干擾之組合物。

【0005】 本發明之另一個目的係提供用於改善蛋白質藥物產品中雜質之檢測之 MCE 分析及組合物。

【發明內容】

【0006】 提供用於評估蛋白質藥物產品樣品之純度及鑑別該蛋白質藥物產品樣品中之雜質之 MCE 分析及試劑。提供用於分析蛋白質藥物樣品中之分析物之方法。較佳蛋白質藥物包括(但不限於)抗體及其抗原結合片段、融合

蛋白及重組蛋白。該分析採用 MCE 技術分離、鑑別及量化蛋白質產品及蛋白質產品中之雜質。雜質包括(但不限於)蛋白質聚集體、蛋白質片段、蛋白質多聚體及分析污染物。亦提供還原及非還原緩衝液。

【0007】 一個實施例提供非還原水性電泳樣品緩衝液，其含有烷基化劑，例如 155 至 175 mM 2-碘乙醯胺；0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰；及 65 至 95 mM 磷酸鈉，其中水性電泳樣品緩衝液之 pH 小於 7。在較佳實施例中，緩衝液之 pH 為 6。在另一個實施例中，水性緩衝液含有 166 mM 2-碘乙醯胺、0.81%十二烷基硫酸鋰及 81 mM 磷酸鈉。

【0008】 亦提供還原緩衝液。在一個實施例中，還原緩衝液係含有 0.5 至 1.5%十二烷基硫酸鋰、55 至 85 mM 磷酸鈉及還原劑之水性電泳樣品緩衝液，其中水性電泳樣品緩衝液之 pH 大於 8。在較佳實施例中，緩衝液之 pH 為 9。在一個實施例中，還原緩衝液含有 135 至 155 mM 二硫蘇糖醇。另一個實施例提供含有 0.69%十二烷基硫酸鋰、69 mM 磷酸鈉及 142 mM 二硫蘇糖醇之還原緩衝液。

【0009】 一個實施例提供用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之非還原 MCE 方法，其包括將蛋白質樣品添加至上述非還原緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品之步驟。將緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃並保持 5 至 15 分鐘，形成變性緩衝蛋白質藥物樣品。在較佳實施例中，將緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 70℃並保持 10 分鐘。

【0010】 將蛋白質藥物樣品與可檢測之標記混合，並在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘，以形成變性之經標記蛋白質藥物樣品。較佳可檢測標記包括(但不限於) Dyomics DY-631 NHS 酯。可以使用其他可檢測標記，包括其他染料、螢光團、發色團、質量標籤、量子點及諸如此類以及美國專利第 6,924,372 號中所揭示之彼等標記，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。在較佳實施例中，將添加有標記之蛋白質藥物樣品加熱至 35℃並保持 30 分鐘。多餘之標記視情況地從樣品去除，例如藉由使用旋轉過濾器。

【0011】 將變性之標記蛋白質藥物產品稀釋並使其在微晶片毛細管電泳系統上經受 MCE 以分離稀釋之蛋白質藥物樣品，從而產生電泳圖。在一個實施例中，從 0.5 mg/ml 開始，然後在微晶片上注射之樣品之最終濃度為 9

μg/ml 至 MCE。電泳圖含有對應於蛋白質藥物產品及雜質之峰。該方法藉由鑑別出電泳圖中對應於污染物或雜質之峰來結束。

【0012】 另一個實施例提供用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之還原 MCE 方法。該方法開始於將蛋白質樣品添加至上述任一種還原緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品。藉由將緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃、較佳 70℃並保持 10 分鐘，使緩衝蛋白質藥物樣品變性，以形成變性蛋白質藥物樣品。將蛋白質藥物樣品與可檢測之標記混合，並在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘，以形成變性之標記蛋白質藥物樣品。在較佳實施例中，將添加有標記之蛋白質藥物樣品加熱至 35℃並保持 30 分鐘。多餘之標籤視情況地從樣品去除，例如藉由使用旋轉過濾器。較佳可檢測標記包括(但不限於) Dyomics DY-631 NHS 酯。可以使用之其他可檢測標記包括其他染料、螢光團、發色團、質量標籤、量子點及諸如此類以及美國專利第 6,924,372 號中所揭示之彼等標記，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【0013】 在一個實施例中，樣品濃度之所建立分析範圍為 0.4 mg/ml 至 0.6 mg/ml，對應於分析之約 7 μg/ml 至 11 μg/ml 之最終濃度，其在微晶片毛細管電泳系統上經受 MCE 分析以產生電泳圖。該方法藉由鑑別出電泳圖中對應於污染物或雜質之峰來結束。

【圖式簡單說明】

【0014】 圖 1A 顯示典型之非還原樣品分析之電泳圖。圖 1B 顯示典型之還原樣品分析之電泳圖。X 軸代表以分鐘為單位之時間，且 Y 軸代表相對螢光單位(RFU)。增加之遷移時間對應於增加之蛋白質大小。

【實施方式】

I. 定義

【0015】 除非本文另有指示或上下文明顯矛盾，否則在描述目前所主張本發明之上下文中(特別是在申請專利範圍之上下文中)使用術語「一(a、an)」、「該」及類似之指代物應解釋為覆蓋單數及複數。

【0016】 除非在此另有指示，否則在此記載之值的範圍僅意欲用作個別提

及落入該範圍內之每個單獨值之速記方法，並且每個單獨值納入本說明書中，就像在本文個別記載一樣。

【0017】術語「約」之使用意欲描述在高於或低於所述值大約+/- 10%範圍內之值；在其他實施例中，此等值之值可以在高於或低於所述值大約+/- 5%之範圍內；在其他實施例中，此等值之值可以在高於或低於所述值之大約+/- 2%之範圍內；在其他實施例中，此等值之值可以在高於或低於所述值之大約+/- 1%之範圍內。前面之範圍意欲藉由上下文來闡明，且並不意味著進一步限制。除非本文另有指示或上下文另外明顯矛盾，否則本文描述之所有方法皆可以任何合適之順序實施。除非另外主張，本文提供之任何及所有實例或例示性語言(例如「諸如」)之使用僅僅意欲更好地說明本發明，而不係對本發明之範圍構成限制。本說明書中之任何語言皆不應解釋為指示任何未主張之元素對於實踐本發明之實施係必不可少的。

【0018】「蛋白質」係指包含藉由肽鍵彼此連接之兩個或更多個胺基酸殘基之分子。蛋白質包括多肽及肽，且亦可包括修飾，例如醣基化、脂質附著、硫酸化、麩胺酸殘基之γ-羧基化、烷基化、羥基化及ADP-核糖基化。蛋白質可以具有科學或商業價值，包括基於蛋白質之藥物，且蛋白質尤其包括酶、配位體、受體、抗體及嵌合或融合蛋白。蛋白質係由各種類型之重組細胞使用熟知細胞培養方法產生，並且通常係藉由遺傳改造技術(例如，編碼嵌合蛋白之序列、密碼子最佳化序列、無內含子序列等)引入細胞中，在該等細胞中其可以作為附加體存在或者整合至細胞之基因組中。

【0019】「抗體」係指由四條多肽鏈(兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L))組成之免疫球蛋白分子，該等重鏈及輕鏈藉由二硫鍵相互連接。每個重鏈具有重鏈可變區(HCVR 或 VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區含有三個結構域，CH1、CH2 及 CH3。每個輕鏈具有輕鏈可變區及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區由一個結構域(CL)組成。VH 及 VL 區可以進一步細分為超變區，稱為互補決定區(CDR)，散佈有更保守之區域，稱為框架區(FR)。每個 VH 及 VL 由三個 CDR 及四個 FR 構成，自胺基末端至羧基末端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。術語「抗體」包括任何同種型或亞類之醣基化及非醣基化免疫球蛋白。術語「抗體」包括藉由重組方式製備、表

現、產生或分離之抗體分子，例如自轉染表現抗體之宿主細胞分離之抗體。術語抗體亦包括雙特異性抗體，其包括可結合至一個以上不同表位之異四聚免疫球蛋白。雙特異性抗體通常描述在美國專利申請公開第 8,586,713 號中，該專利申請以引用方式併入本申請中。

【0020】「Fc 融合蛋白」包含兩種或更多種蛋白質之一部分或全部，其中一種係免疫球蛋白分子之 Fc 部分，該兩種蛋白質在自然界中原本係不存在的。包含與抗體衍生多肽之不同部分(包括 Fc 結構域)融合之某些異源多肽之融合蛋白之製備已描述於例如 Ashkenazi 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 10535 (1991)；Byrn 等人，Nature 344:677 (1990)；及 Hollenbaugh 等人，「Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins」, Current Protocols in Immunology, 增刊 4, 第 10.19.1 - 10.19.11 頁(1992)。「受體 Fc 融合蛋白」包含與 Fc 部分偶聯之受體之一或多個胞外結構域，在一些實施例中，該等胞外結構域包含接在免疫球蛋白 CH2 及 CH3 結構域之後之鉸鏈區。在一些實施例中，Fc 融合蛋白包含結合至一或多個配位體之兩個或更多個不同之受體鏈。舉例而言，Fc 融合蛋白係陷阱，例如 IL-1 陷阱或 VEGF 陷阱。

【0021】術語「MCE」或「微晶片毛細管電泳」係指基於微晶片之分析物毛細管電泳(CE)分離。

II. MCE 分析及緩衝液

【0022】提供用於分析蛋白質藥物樣品中之分析物之方法。較佳蛋白質藥物包括(但不限於)抗體及其抗原結合片段、融合蛋白及重組蛋白。該等分析採用 MCE 技術來分離、鑑別及量化蛋白質產品及蛋白質產品中之雜質。雜質包括(但不限於)蛋白質聚集體、蛋白質片段、蛋白質多聚體及分析污染物。亦提供還原及非還原緩衝液。

A. 緩衝液

1. 非還原緩衝液

【0023】一個實施例提供非還原水性電泳樣品緩衝液，其含有 155 至 175 mM 烷基化劑，例如 2-碘乙醯胺或 NEM；0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰；及 75 至 95 mM 磷酸鈉，其中水性電泳樣品緩衝液之 pH 小於 7。在較佳實施

例中，緩衝液之 pH 為 6。在另一個實施例中，水性緩衝液含有 166 mM 2-碘乙醯胺、0.81%十二烷基硫酸鋰及 81 mM 磷酸鈉。

2. 還原緩衝液

【0024】 亦提供還原緩衝液。在一個實施例中，還原緩衝液係含有 0.5 至 1.5%十二烷基硫酸鋰、65 至 95 mM 磷酸鈉及還原劑之水性電泳樣品緩衝液，其中水性電泳樣品緩衝液之 pH 大於 8。在較佳實施例中，緩衝液之 pH 為 9。

【0025】 還原劑為業內已知。例示性還原劑包括(但不限於)二硫蘇糖醇(DTT，CAS 3483-12-3)、β-巯基乙醇(BME、2BME、2-ME、b-mer，CAS 60-24-2)、2-胺基乙烷硫醇(2-MEA-HCl，亦稱為半胱胺-HCl，CAS 156-57-0)、三(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(TCEP，CAS 5961-85-3)、半胱胺酸鹽酸鹽(Cys-HCl, CAS 52-89-1)或 2-巯基乙烷磺酸鈉鹽(MESNA)。用於還原蛋白質鍵之其他方法為業內已知，例如含有樹脂之固定化還原劑管柱，基於硫醇之還原劑已固定至該樹脂，以實現肽及蛋白質二硫鍵之固相還原。亦設想適於還原多肽之間之化學相互作用之還原劑(包括氧化劑)。

【0026】 在一個實施例中，還原緩衝液含有 135 至 155 mM 二硫蘇糖醇。

【0027】 另一個實施例提供含有 0.69%十二烷基硫酸鋰、69 mM 磷酸鈉及 142 mM 二硫蘇糖醇之還原緩衝液。

B. 分析

1. 非還原分析

【0028】 一個實施例提供一種用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之非還原 MCE 方法，該方法包括將蛋白質樣品添加至上述非還原緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品之步驟。將緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃並保持 5 至 15 分鐘，形成變性緩衝蛋白質藥物樣品。在較佳實施例中，將緩衝之蛋白質藥物樣品加熱至 70℃並保持 10 分鐘。然後將可檢測標記添加至變性緩衝蛋白質藥物樣品，並在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘以形成變性標記之蛋白質藥物樣品。在較佳實施例中，將添加有標記之變性蛋白質藥物樣品加熱至 35℃並保持 30 分鐘。多餘之標籤視情況地從樣品去除，例如藉由使用旋轉過濾器。

【0029】較佳可檢測標記包括(但不限於) Dyomics DY-631 NHS 酯。可使用其他可檢測之標記，包括其他染料、螢光團、發色團、質量標籤、量子點及諸如此類以及美國專利第 6,924,372 號中所揭示之那些標記，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【0030】將變性之標記蛋白質藥物產品稀釋並使其在微晶片毛細管電泳系統上經受 MCE 以分離稀釋之蛋白質藥物樣品，從而產生電泳圖。在一個實施例中，從 0.5 mg/ml 開始，然後在微晶片上注射之樣品之最終濃度為 9 μg/ml 至 MCE。電泳圖含有對應於蛋白質藥物產品及雜質之峰。該方法藉由鑑別電泳圖中對應於污染物或雜質之峰來結束。

2. 還原分析

【0031】另一個實施例提供一種用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之還原 MCE 方法。該方法開始於將蛋白質藥物樣品添加至上述任一種還原緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品。藉由將緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃、較佳 70℃並保持 10 分鐘，使緩衝蛋白質藥物樣品變性，以形成變性蛋白質藥物樣品。然後將添加有標記之蛋白質藥物樣品在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘，形成變性之標記蛋白質藥物樣品。在較佳實施例中，將添加有標籤之蛋白質藥物產品樣品加熱至 35℃並保持 30 分鐘。多餘之標籤視情況地從樣品去除，例如藉由使用旋轉過濾器。較佳可檢測標記包括(但不限於) Dyomics DY-631 NHS 酯。可使用之其他可檢測標記包括其他染料、螢光團、發色團、質量標籤、量子點及諸如此類以及美國專利第 6,924,372 號中所揭示之那些標記，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【0032】在一個實施例中，樣品濃度之所建立分析範圍為 0.4 mg/ml 至 0.6 mg/ml，對應於分析之約 7 μg/ml 至 11 μg/ml 之最終濃度，其在微晶片毛細管電泳系統上經受 MCE 分析以產生電泳圖。該方法藉由鑑別電泳圖中對應於污染物或雜質之峰來結束。

C. 儀器

【0033】用於實施所揭示 MCE 分析之儀器在市面上有售。在較佳實施例中，所揭示之 MCE 分析係使用 LabChip GXII 或 LabChip GXII 觸摸 HT 及 LabChip® HT 蛋白質表現晶片來實施。

III. 所關注蛋白質

【0034】 使用所揭示 MCE 分析及試劑分析之所關注蛋白質(例如蛋白質藥物產品)可為適於在原核或真核細胞中表現之任一所關注蛋白質且可用於所提供之經改造宿主細胞系統中。舉例而言，所關注蛋白質包括(但不限於)抗體或其抗原結合片段、嵌合抗體或其抗原結合片段、ScFv 或其片段、Fc 融合蛋白或其片段、生長因子或其片段、細胞介素或其片段、或細胞表面受體之胞外結構域或其片段。所關注蛋白質可為由單個亞單位組成之簡單多肽或包含兩個或更多個亞單位之複雜多亞單位蛋白質。所關注蛋白質可為生物製藥產品、食品添加劑或防腐劑或任何經受純化及品質標準之蛋白質產品。

【0035】 在一些實施例中，蛋白質藥物產品(所關注蛋白質)係抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙價抗體、三價抗體或四價抗體、Fab 片段或 F(ab')2 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體係 IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體係 IgG2 抗體。在一個實施例中，抗體係 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體係嵌合 IgG2/IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體係嵌合 IgG2/IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體係嵌合 IgG2/IgG1/IgG4 抗體。

【0036】 在一些實施例中，抗體係選自由以下組成之群：抗程式性細胞死亡 1 抗體(例如如美國專利申請公開第 US2015/0203579A1 號中所述之抗 PD1 抗體)、抗程式性細胞死亡配位體-1 (例如如美國專利申請公開第 US2015/0203580A1 號中所述之抗 PD-L1 抗體)、抗 Dll4 抗體、抗血管生成素-2 抗體(例如如美國專利第 9,402,898 號中所述之抗 ANG2 抗體)、抗血管生成素樣 3 抗體(例如如美國專利第 9,018,356 號中所述之抗 AngPtl3 抗體)、抗血小板源生長因子受體抗體(例如如美國專利第 9,265,827 號中所述之抗 PDGFR 抗體)、抗 Erb3 抗體、抗泌乳素受體抗體(例如如美國專利第 9,302,015 號中所述之抗 PRLR 抗體)、抗補體 5 抗體(例如如美國專利申請公開第 US2015/0313194A1 號中所述之抗 C5 抗體)、抗 TNF 抗體、抗表皮生長因子受體抗體(例如如美國專利第 9,132,192 號中所述之抗 EGFR 抗體或如美國專

利申請公開第 US2015/0259423A1 號中所述之抗 EGFRvIII 抗體)、抗前蛋白轉化酶枯草溶菌素-9 抗體(例如如美國專利第 8,062,640 號或美國專利申請公開第 US2014/0044730A1 號中所述之抗 PCSK9 抗體)、抗生長及分化因子-8 抗體(例如抗 GDF8 抗體，亦稱為抗肌骨素抗體，如美國專利第 8,871,209 或 9,260,515 號中所述)、抗升糖素受體(例如如美國專利申請公開第 US2015/0337045A1 或 US2016/0075778A1 號中所述之抗 GCGR 抗體)、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、介白素 4 受體抗體(例如如美國專利申請公開第 US2014/0271681A1 號或美國專利第 8,735,095 號或第 8,945,559 號中所述之抗 IL4R 抗體)、抗介白素 6 受體抗體(例如如美國專利第 7,582,298 號、第 8,043,617 號或第 9,173,880 號中所述之抗 IL6R 抗體)、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗介白素 33 (例如如美國專利第 9,453,072 號或第 9,637,535 號中所述之抗 IL33 抗體)、抗呼吸道融合病毒抗體(例如如美國專利第 9,447,173 號中所述之抗 RSV 抗體)、抗分化簇 3 (例如如美國專利第 9,657,102 號及申請公開第 US20150266966A1 號及美國申請第 62/222,605 號中所述之抗 CD3 抗體)、抗分化簇 20 (例如如美國專利第 9,657,102 號及申請公開第 US20150266966A1 號及美國專利第 7,879,984 號中所述之抗 CD20 抗體)、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗分化簇-48 (例如如美國專利第 9,228,014 號中所述之抗 CD48 抗體)、抗 Fel d1 抗體(例如如美國專利第 9,079,948 號中所述)、抗中東呼吸症候群病毒(例如如美國專利申請公開第 US2015/0337029A1 號中所述之抗 MERS 抗體)、抗埃博拉病毒(Ebola virus)抗體(例如如美國專利申請公開第 US2016/0215040 號中所述)、抗茲卡病毒(Zika virus)抗體、抗淋巴球活化基因 3 抗體(例如抗 LAG3 抗體或抗 CD223 抗體)、抗神經生長因子抗體(例如如美國專利申請公開第 US2016/0017029 號及美國專利第 8,309,088 號及第 9,353,176 號中所述之抗 NGF 抗體)及抗活化素 A 抗體。在一些實施例中，雙特異性抗體係選自由以下組成之群：抗 CD3 ×抗 CD20 雙特異性抗體(如美國專利第 9,657,102 號及申請公開第 US20150266966A1 號中所述)、抗 CD3 ×抗黏液素 16 雙特異性抗體(例如抗 CD3 ×抗 Muc16 雙特異性抗體)及抗 CD3 ×抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體(例如抗 CD3 ×抗 PSMA 雙特異性抗

體)。在一些實施例中，所關注蛋白質係選自由以下組成之群：阿昔單抗(abciximab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿達木單抗-atto、阿多-曲妥珠單抗(ado-trastuzumab)、阿倫珠單抗(alemtuzumab)、阿利人單抗(alirocumab)、阿替珠單抗(atezolizumab)、阿維魯單抗(avelumab)、巴利昔單抗(basiliximab)、貝利木單抗(belimumab)、苯雷利珠單抗(benralizumab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、貝洛托單抗(bezlotoxumab)、布利莫單抗(blinatumomab)、貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin)、布羅達單抗(brodalumab)、卡那單抗(canakinumab)、卡羅單抗噴地肽(capromab pendetide)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol)、賽美麗單抗(cemiplimab)、西妥昔單抗(cetuximab)、地諾單抗(denosumab)、地妥昔單抗(dinutuximab)、度匹魯單抗(dupilumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、依庫珠單抗(eculizumab)、埃洛妥珠單抗(elotuzumab)、艾美賽珠單抗(emicizumab)-kxwh、阿利人單抗艾坦辛(emtansinealirocumab)、依伐單抗(evinacumab)、依伏庫單抗(evolocumab)、法希姆單抗(fasinumab)、戈利木單抗(golimumab)、古塞庫單抗(guselkumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、依達賽珠單抗(idarucizumab)、英夫利昔單抗(infliximab)、英夫利昔單抗-abda、英夫利昔單抗-dyyb、伊匹單抗(ipilimumab)、伊珠單抗(ixekizumab)、美泊利單抗(mepolizumab)、奈昔木單抗(necitumumab)、奈伐單抗(nesvacumab)、尼沃魯單抗(nivolumab)、奧托昔單抗(obiltoxaximab)、奧妥珠單抗(obinutuzumab)、歐瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、奧拉單抗(olaratumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、派姆單抗(pembrolizumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、雷莫蘆單抗(ramucirumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、瑞西巴庫單抗(raxibacumab)、瑞麗珠單抗(reslizumab)、利諾庫單抗(rinucumab)、利妥昔單抗(rituximab)、賽瑞蘆單抗(sarilumab)、蘇金單抗(secukinumab)、司妥昔單抗(siltuximab)、托西莫單抗(tocilizumab)、托西莫單抗、曲妥珠單抗(trastuzumab)、曲弗單抗(trevogrumab)、優特克單抗(ustekinumab)及維多珠單抗(vedolizumab)。

【0037】在一些實施例中，所關注蛋白質係含有Fc部分及另一結構域之重組蛋白(例如，Fc融合蛋白)。在一些實施例中，Fc融合蛋白係受體Fc融合

蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之受體之一或多個細胞外結構域。在一些實施例中，Fc 部分包含鉸鏈區，其後為 IgG 之 CH2 及 CH3 結構域。在一些實施例中，受體 Fc 融合蛋白含有兩個或更多個不同之受體鏈，其結合至單個配位體或多個配位體。舉例而言，Fc 融合蛋白係 TRAP 蛋白，例如 IL-1 陷阱(例如，列洛西普(rilonacept)，其含有與 hIgG1 之 Fc 融合之 Il-1R1 細胞外區融合之 IL-1RAcP 配位體結合區；見美國專利第 6,927,004 號，其全文以引用方式併入本文中)或 VEGF 陷阱(例如，阿柏西普(aflibercept)或 ziv-阿柏西普，其包含與 hIgG1 之 Fc 融合之 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 結構域 3 之 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 結構域 2；見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號)。在其他實施例中，Fc 融合蛋白係 ScFv-Fc 融合蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之抗體之一或多個抗原結合結構域，例如可變重鏈片段及可變輕鏈片段。

IV. 細胞培養物

【0038】使用所揭示之 MCE 分析及試劑分析之蛋白質藥物產品係所產生之細胞培養物。細胞培養物可為「進料分批細胞培養物」或「進料分批培養物」，其係指分批培養物，其中細胞及培養基最初供應至培養容器中，並且在培養過程中，在終止培養之前，在有或沒有週期性細胞及/或產物收穫之情況下，以不連續之增量將額外之培養營養物緩慢進給至培養物中。進料分批培養包括「半連續進料分批培養」，其中週期性地去除整個培養物(可能包括細胞及培養基)，並用新鮮培養基代替。進料分批培養不同於簡單的「分批培養」，而用於細胞培養之所有組分(包括動物細胞及所有培養營養物)在分批培養之培養過程開始時供應至培養容器。進料分批培養可以不同於「灌注培養」，由於在標準進料分批過程中上清液沒有自培養容器中去除，而在灌注培養中，細胞藉由例如過濾限制在培養物中，並且培養基連續或間歇地引入培養容器中並自培養容器去除。然而，考慮在進料分批細胞培養期間出於測試目的去除樣品。進料分批過程繼續進行，直至確定達到最大工作體積及/或蛋白質產量，然後收獲蛋白質。

【0039】 細胞培養物可為「連續細胞培養物」，其係一種用於連續生長細胞之技術，通常在特定之生長階段。舉例而言，若需要持續供應細胞，或需要生產特定之所關注蛋白質，則細胞培養可能需要維持在特定之生長階

段。因此，為了將細胞維持在該特定階段，必須持續監控並相應地調整條件。

【0040】 將細胞在細胞培養基中培養。術語「細胞培養基」及「培養基」係指用於生長哺乳動物細胞之營養液，其通常提供促進細胞生長所需之營養物，例如碳水化合物能量源、必需胺基酸(例如苯丙胺酸、纈胺酸、蘇胺酸、色胺酸、蛋胺酸、白胺酸、異白胺酸、離胺酸及組胺酸)及非必需胺基酸(例如丙胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸及酪胺酸)、微量元素、能量源、脂質、維生素等。細胞培養基可以含有提取物，例如血清或蛋白胨(水解產物)，其供應支持細胞生長之原料。培養基可以含有酵母源或大豆提取物，而非動物源提取物。化學定義之培養基係指其中所有化學組分皆已知(即具有已知化學結構)之細胞培養基。化學定義之培養基完全不含動物源組分，如血清或動物源蛋白胨。在一個實施例中，培養基係化學定義之培養基。

【0041】 溶液亦可含有能提高生長及/或存活率超過最小速率之組分，包括激素及生長因子。溶液可以配製成對於培養之特定細胞之存活及增殖最佳之 pH 及鹽濃度。

【0042】 「細胞系」係指經由細胞之連續傳代或傳代培養自特定譜系中獲得之一或多種細胞。術語「細胞」與「細胞群」可互換使用。

【0043】 術語「細胞」包括適於表現重組核酸序列之任何細胞。細胞包括原核生物及真核生物之細胞，例如細菌細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、非人動物細胞、鳥類細胞、昆蟲細胞、酵母細胞或細胞融合物，例如雜交瘤或四體雜交瘤。在某些實施例中，細胞係人類、猴子、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在其他實施例中，細胞係選自以下細胞：中國倉鼠卵巢(CHO)(例如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS (例如 COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎臟(例如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球(例如 Jurkat (T 淋巴球)或 Daudi (B 淋巴球))、A431 (表皮)、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞之細胞系。在一些實施例中，細胞包含一或多個病毒基因，

例如表現病毒基因之視網膜細胞(例如 PER.C6®細胞)。在一些實施例中，細胞係 CHO 細胞。在其他實施例中，細胞係 CHO K1 細胞。

V. 套組

【0044】 一個實施例提供一種套組，該套組包括一或多種所揭示之緩衝液或製備所揭示緩衝液之成份。套組可包括用於緩衝液或成份之容器。緩衝液可為溶液或凍乾形式。套組視情況地亦包括第二容器，該第二容器含有凍乾製劑之稀釋劑或重構溶液；及視情況地使用溶液或重構及/或使用凍乾緩衝液或粉末成份之說明書。

【0045】套組可另外包括實施所揭示 MCE 分析所需之其他試劑，包括緩衝液、稀釋劑及過濾器中之一或多種。緩衝液及試劑可在瓶子、小瓶或試管中。

實例

實例 1：治療性蛋白質之純度及雜質分析之 MCE 分析.

方法及材料：

材料：

【0046】 將 LabChip GXII 或 LabChip GXII 觸摸 HT 及 LabChip® HT 蛋白質表現晶片用於毛細管電泳分離及數據收集(Perkin Elmer)。將上文所揭示之非還原及還原變性緩衝液用於 MCE 分析。

方法：

【0047】表 1 顯示用於製備 MCE 分析之樣品之工作流程。簡言之，將蛋白質樣品稀釋至 0.5 mg/ml。將 1 µl 非還原(NR)或還原(R)變性緩衝液及 4 µl 稀釋樣品添加至 96 孔板。將樣品混合、離心並在產品規定之溫度(通常為 75℃)下加熱 10 分鐘。然後用 5 µM 市售染料(例如 Dyomics DY-631 NHS 酯)標記樣品。將樣品混合，離心，然後在 35℃加熱 30 分鐘。然後用 105 µl 稀終止溶液稀釋標記之樣品。使用 LabChip GXII 或 LabChip GXII 觸摸 HT 分離樣品。

緩衝液

【0048】製備 200 mM 一水合磷酸鈉、200 mM 二水合磷酸鈉及 10%十二烷基硫酸鋰(LDS)之儲備溶液。使用儲備溶液及 Milli-Q®水，製備 100 mM 磷

酸鈉 1% LDS pH 6 及 100 mM 磷酸鈉 1% LDS pH 9 之溶液。

【0049】 藉由添加 34 μL 1M 碘乙醯胺(IAM) (在 Milli-Q®水中新鮮製備) + 166 μL 100 mM 磷酸鈉 1% LDS pH 6 + 5 μL Milli-Q®水來製備非還原緩衝液。最終濃度為 166 mM 2-碘乙醯胺、0.81%十二烷基硫酸鋰及 81 mM 磷酸鈉。

【0050】藉由添加 68 μL 10x 還原劑(500 mM 二硫蘇糖醇(DTT) + 166 μL 100 mM 磷酸鈉 1% LDS pH 9 + 6 μL Milli-Q®水)製備還原緩衝液。最終濃度為 0.69%十二烷基硫酸鋰；69 mM 磷酸鈉及 142 mM 二硫蘇糖醇。

表 1. 用於 MCE 分析之樣品製備方法.

樣品製備	
NR	R
4 μl 0.5 mg/mL 樣品 1 μL NR 緩衝液	4 μl 0.5 mg/mL 樣品 1 μL R 緩衝液
混合，離心，在規定溫度下加熱 10 分鐘	
樣品標記	
5 μL 變性樣品	
5 μL 5μM PICO 染料	
混合，離心，在 35℃下加熱 30 分鐘	
最終稀釋	
5 μL 標記樣品 105 μL 稀終止樣品	
分離方法	
HT PICO 蛋白質表現 200	

結果：

【0051】微晶片毛細管電泳(MCE)可大幅縮短樣品分析時間，同時保持 QC 分析所需之性能及重現性標準。使用本文所揭示之非還原及還原變性緩衝液開發 MCE 分析。圖 1A-1B 顯示代表性電泳圖，其顯示非還原樣品及還原樣品中蛋白質之分析。

【0052】 雖然在前面之說明書中，已經針對本發明之某些實施例描述了本發明，並且出於說明之目的，已經提出了許多細節，但熟習此項技術者將明瞭本發明容易受到其他實施例之影響，並且在不背離本發明之基本原理之情況下，本文描述之某些細節可以有相當大之變化。

【0053】 此處引用之所有參考文獻之全文皆以引用方式併入本文中。在不背離本發明之精神或基本屬性之情況下，本發明可以其他特定形式體現，因此，應當參考所附申請專利範圍，而非前述說明書，以指示本發明之範圍。

專利申請案第 108108839 號
ROC Patent Appln. No. 108108839
修正後無劃線之申請專利範圍中文本－附件(五)
Amended Claims in Chinese－Encl.(V)
(民國 111 年 05 月 27 日送呈)
(Submitted on May 27, 2022)

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】 一種水性電泳樣品緩衝液，其包含：

155 至 175 mM 2-碘乙醯胺；

0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰；及

75 至 95 mM 磷酸鈉，

其中該水性電泳樣品緩衝液之 pH 小於 7。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項之水性電泳樣品緩衝液，其中該 pH 為 6。

【第 3 項】如申請專利範圍第 1 項之水性電泳樣品緩衝液，其包含 166 mM 2-碘乙醯胺、0.81%十二烷基硫酸鋰及 81 mM 磷酸鈉。

【第 4 項】 一種水性電泳樣品緩衝液，其係由以下組成：

166 mM 2-碘乙醯胺，

0.81%十二烷基硫酸鋰，及

81 mM 磷酸鈉，

其中該水性電泳樣品緩衝液之 pH 為 6.0。

【第 5 項】 一種用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之方法，該方法包含以下步驟：

將該蛋白質藥物樣品添加至水性電泳樣品緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品，該水性電泳樣品緩衝液包含 155 至 175 mM 2-碘乙醯胺、0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰、及 75 至 95 mM 磷酸鈉，其中水性電泳樣品緩衝液之 pH 小於 7；

將該緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃並保持 5 至 15 分鐘以形成變性緩衝蛋白質藥物樣品；

將可檢測標記添加至該變性緩衝蛋白質藥物樣品且將其在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘以形成變性標記之蛋白質藥物樣品；

稀釋該變性標記之蛋白質藥物樣品且使其在微晶片毛細管電泳系統上進行微晶片毛細管電泳以分離該稀釋變性標記之蛋白質藥物樣品，從而產生電泳圖；及

鑑別該電泳圖中對應於污染物或雜質之峰。

【第 6 項】 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中將該緩衝蛋白質藥物樣品

在 70℃下加熱 10 分鐘。

【第 7 項】 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中將該變性緩衝蛋白質藥物樣品在 35℃下加熱 30 分鐘。

【第 8 項】 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該稀釋之蛋白質藥物樣品為 9 μg/ml。

【第 9 項】如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該可檢測標記為 DY-631 N-羥基琥珀醯亞胺基酯。

【第 10 項】一種用於鑑別蛋白質藥物樣品中之污染物或雜質之方法，該方法包含以下步驟：

將蛋白質樣品添加至水性電泳樣品緩衝液以形成緩衝蛋白質藥物樣品，該水性電泳樣品緩衝液包含 0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰、45 至 75 mM 磷酸鈉、及還原劑，其中該水性電泳樣品緩衝液之 pH 大於 8；

將該緩衝蛋白質藥物樣品加熱至 65 至 85℃並保持 5 至 15 分鐘以形成變性蛋白質藥物樣品；

將可檢測標記添加至該變性蛋白質藥物樣品且將其在 30 至 40℃下加熱 20 至 40 分鐘以形成變性標記之蛋白質藥物樣品；

稀釋該變性標記之蛋白質藥物樣品且使其在微晶片毛細管電泳系統上進行微晶片毛細管電泳分析以產生電泳圖；及

鑑別該電泳圖中對應於污染物或雜質之峰。

【第 11 項】 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中將該緩衝蛋白質藥物樣品在 70℃下加熱 10 分鐘。

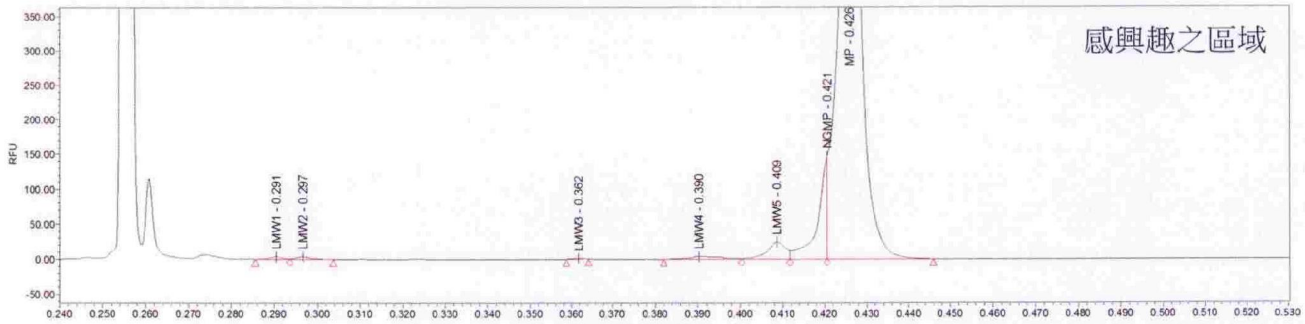
【第 12 項】 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中將該變性蛋白質藥物樣品在 35℃下加熱 30 分鐘。

【第 13 項】 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該稀釋之蛋白質藥物樣品為 9 μg/ml。

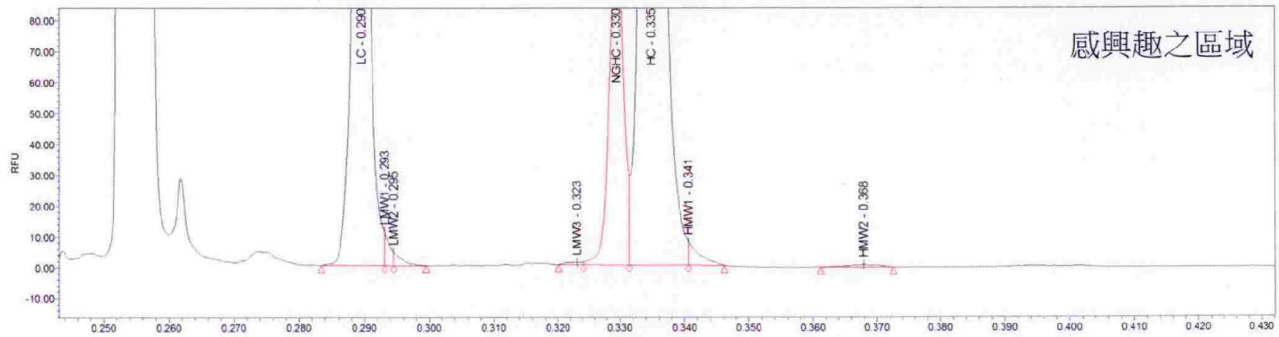
【第 14 項】一種套組，其包含含有 155 至 175 mM 2-碘乙醯胺、0.50 至 1.5%十二烷基硫酸鋰、及 75 至 95 mM 磷酸鈉的水性電泳樣品緩衝液，其中該水性電泳樣品緩衝液之 pH 小於 7；及

用於在該緩衝液中製備電泳用樣品之書面說明書。

【發明圖式】


感興趣之區域
RFU
LMW1 - 0.291
LMW2 - 0.297
LMW3 - 0.362
LMW4 - 0.390
LMW5 - 0.409
NGMP - 0.421
MP - 0.426
分鐘

【圖 1A】


感興趣之區域
RFU
LC - 0.290
LMW3 - 0.293
LMW2 - 0.295
LMW0 - 0.323
NGHC - 0.330
HC - 0.335
HMW1 - 0.341
HMW2 - 0.368
分鐘

【圖 1B】