

【11】證書號數：I938659

【45】公告日：中華民國 115 (2026) 年 09 月 11 日

【51】Int. Cl. : C07K16/06 (2006.01) C07K16/28 (2006.01)
C07K16/32 (2006.01) C07K1/18 (2006.01)

發明

全 10 頁

【54】名稱：生成包含有兩種或更多種抗體的組成物之技術

【21】申請案號：113139107

【22】申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 14 日

【11】公開編號：202521568

【43】公開日期：中華民國 114 (2025) 年 06 月 01 日

【30】優先權：2019/02/14

歐洲專利局

19157286.6

2019/06/05

歐洲專利局

19178542.7

【72】發明人：多諾伯斯 羅伯特 P (NL) DOORNBOS, ROBERT PAUL ; 巴克 亞歷山大 B H (NL) BAKKER, ALEXANDER BERTHOLD HENDRIK

【71】申請人：荷蘭商美勒斯有限公司 MERUS B.V.
荷蘭

【74】代理人：劉法正；尹重君

審查人員：簡正芳

【57】申請專利範圍

1. 一種用以生成 2-10 種抗體的方法，其中該等抗體包含至少一單特異性及至少一多特異性抗體，包括：
 - 提供帶有編碼該等抗體的核酸之細胞；
 - 培養該等細胞；
 - 從培養物來收集該等抗體；以及
 - 藉由離子交換層析法(IEX)而將該等被生成的抗體與半抗體分開來；該方法特徵在於：在所使用的 IEX 條件下，該等抗體展現出 IEX 滯留時間係與個別的抗體之滯留時間的平均值偏差為 10% 或者更低，其中該 IEX 是係陽離子交換層析法，其在一為 5 至 9 的 pH 範圍下被執行。
2. 一種用以生成 2-10 種抗體的方法，其中該等抗體包含至少一單特異性及至少一多特異性抗體，包括：
 - 提供帶有編碼該等抗體的核酸之細胞；
 - 培養該等細胞；
 - 從培養物來收集該等抗體；以及
 - 藉由離子交換層析法(IEX)而將該等被生成的抗體與半抗體分開來；該方法特徵在於：在所使用的 IEX 條件下，該等抗體展現出 IEX 滯留時間係與個別的抗體之滯留時間的平均值偏差為 10% 或者更低，以及該等抗體具有等電點(pI)，其係與該等抗體的平均 pI 值差異為 0.4 單位或更少。
3. 如請求項 1 或 2 的方法，其進一步包括選擇在所使用的 IEX 條件下具有基本上相同的 IEX 滯留時間之至少兩種抗體。
4. 如請求項 1 或 2 的方法，其中從該培養物來收集該等抗體包括藉由抗體親和力純化而從其他蛋白質純化出抗體。
5. 如請求項 4 的方法，其中從該培養物來收集該等抗體包括藉由蛋白質 A 萃取而從其他蛋白質純化出抗體。

6. 如請求項 4 的方法，其中進一步包括將親和力純化的抗體引至粒徑篩析層析法(size-exclusion chromatography)、凝膠過濾層析法和/或陰離子交換層析法。
7. 如請求項 1 或 2 的方法，其中在該 IEX 之後，被收集的抗體係藉由疏水性交互作用層析法(HIC)來予以定量分析相對的表現位準。
8. 如請求項 7 的方法，其中被收集的抗體之特異性係藉由 ELISA 來予以驗證。
9. 如請求項 1 或 2 的方法，其中各別的半抗體之滯留時間係落在該等抗體的滯留時間所跨距的範圍之外。
10. 如請求項 9 的方法，其中該等細胞生成 3 種重鏈。
11. 如請求項 10 的方法，其中該等重鏈包含有供重鏈之有效異二聚體化的領域。
12. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體之中的至少兩者為多特異性抗體。
13. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體之中的至少兩者為雙特異性抗體。
14. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體之中的至少兩者為單特異性抗體。
15. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體之中的至少兩者共享一個相同的重鏈。
16. 如請求項 1 的方法，其中該等抗體具有等電點(pI)，其係與該至少兩種抗體的平均 pI 值差異為 0.4 單位或更少。
17. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體被選擇以供具有重鏈與輕鏈組合，該等重鏈與輕鏈組合在所使用的 IEX 條件下具有滯留時間係明顯地不同於完整抗體的滯留時間。
18. 如請求項 17 的方法，其中重鏈與輕鏈組合的 pI 值與該至少兩種抗體的平均 pI 值差異為 0.4 單位或更少。
19. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體具有重鏈包含有一個有利於重鏈之異二聚體化的 CH3 領域。
20. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等抗體具有 IgG 重鏈。
21. 如請求項 1 或 2 的方法，其中該等細胞生成兩種或更多種重鏈，其中一個重鏈包含有位在 CH3 區中的胺基酸取代 L351K 和 T366K (EU 編號)，而另一個重鏈包含有位在 CH3 區中的胺基酸取代 L351D 和 L368E。
22. 一種包含有 2-10 種重組型抗體的組成物，其中該等抗體包含藉由如請求項 1-21 中任一者之方法所生成之至少一單特異性及至少一多特異性抗體，以及其中該等抗體之中的至少兩者共享一個相同的重鏈。
23. 如請求項 22 的組成物，特徵在於：對於所有的該等抗體，該等 IEX 滯留時間和/或該等 pI 值基本上是相同的。

圖式簡單說明

圖 1 為具體例之一示意圖示，其中該組成物包含有兩個雙特異性抗體係共享一共同臂。該圖描繪帶有重鏈(1)以及輕鏈(4)的抗體。4 個重鏈具有 3 個不相同的可變區(5、6 以及 7)。具有該共享的可變區(5)之重鏈具有一個異二聚體化領域的一個部分(3)。帶有可變區(6)以及(7)的該等重鏈具有該異二聚體化領域之相容的部分(2)。異二聚體化區(2)以及(3)之被偏好的配對可以引導雙特異性抗體的形成。

圖 2 顯示圖片 A：雙特異性抗體 PB4516 生成編號 8 (p08)在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖；圖片 B：雙特異性抗體 PB6892 生成編號 4 (p04)在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖。

圖 3 顯示圖 3a：雙特異性抗體 PB4516 生成編號 10 (p10)在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖；圖 3b：雙特異性抗體 PB11244 生成編號 1 (p01)在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖；圖 3c：每個框有兩種雙特異性抗體被識別於直行 PB (PBXXXX(X))中。關於 PB11244 和 PB4516 的重鏈可變區被表明於直行標靶 1 和標靶 2 中。輕鏈的序列對於所有的抗體係為相同的並且具

有序列辨識編號：26 的共同輕鏈 IgKV1*39/jk1 之胺基酸序列。對於每一個重鏈可變區，以 ExPASy ProtParam 工具予以計算的 pI 值被表明於直行 pI 中。該兩種重鏈可變區之間的 pI 值差異被表明於最後的直行中，證明了 PB11244 和 PB4516 之間的平均 V_{HpI} 值差異係為 0.08。

圖 4 顯示池 FST2 之個別的群落 cp12 之一抗體製備物在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖。該 CIEEX-曲線圖顯示共洗提抗體 PB4516 和 PB11244 之一銳峰。該曲線圖顯示：該樣品含有一有限數量的產物相關雜質。它亦顯示共洗提雙特異性抗體和各自徙動的產物相關雜質之間的良好分離。

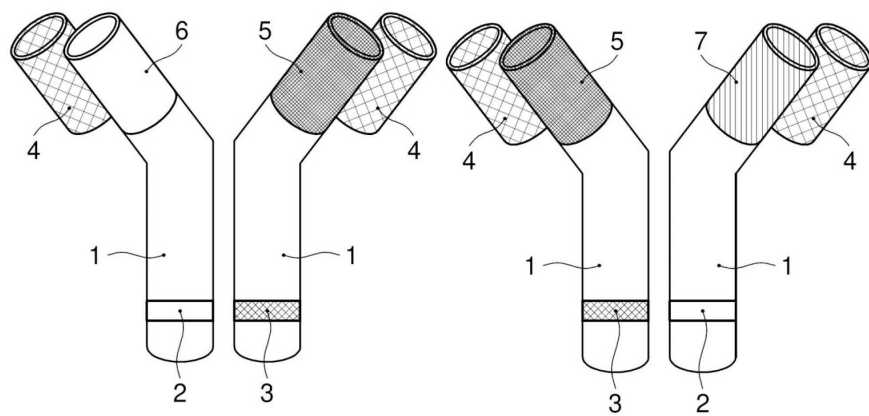
圖 5 顯示群落 CP07 之一抗體製備物在 220 nm 之下的 CIEEX-曲線圖。該群落係從單一群落 FST2cp09 的個別群落之一收集而被挑選出。第二次的次選殖被完成，俾以確保 FST2cp09-cp07 細胞株是一個單源性細胞株。雙特異性抗體特異性 ELISA 表明 743 $\mu\text{g/mL}$ 的 EGFR/HER2 雙特異性抗體 PB11244 以及 1134 $\mu\text{g/mL}$ 的 EGFR/HER3 雙特異性抗體 PB4516 之存在。

圖 6 顯示具有兩個相同的可變領域之抗體同質二聚體(PGXXXX)的滯留時間。該重鏈可變區的胺基酸序列具有圖 8 中針對 MF 所出示的序列以及一為序列辨識編號：26 的共同輕鏈 IgKV1*39/jk1。

圖 7 顯示每個框有兩種雙特異性抗體被識別於直行 PB (PBXXXX(X))中。該等雙特異性抗體的每一者之重鏈可變區(MFXXXX)被表明於直行標靶 1 和標靶 2 中。輕鏈的序列對於所有的抗體係為相同的並且具有序列辨識編號：26 的共同輕鏈 IgKV1*39/jk1 之胺基酸序列。對於每一個重鏈可變區，以 ExPASy ProtParam 工具予以計算的 pI 值被表明於直行 pI 中。兩個重鏈可變區之間的 pI 值差異以及被測量的滯留時間被表明於最後兩個直行中。被測量的滯留時間以及被計算的 pI 值和平均 pI 值表明：一對的雙特異性抗體在 CIEEX 層析中可以有效地共洗提。該等抗體具有 IgG1 恆定區以及一個共同輕鏈。具有共享重鏈可變區(相同的 MF)之帶有 CH3 DE 重鏈或 KK 重鏈的重鏈被表明。關於在每個特異性抗體上所執行的 CIEEX 層析之滯留時間被表明，有一個用於 CIEEX 層析的例示性條件被描述於材料與方法章節中。許多其他的 CIEEX 層析條件將會導致合適的滯留時間係介於被條列之具有所提供的 pI 數值之雙特異性抗體配對之間。

圖 8 顯示各別的抗體之重鏈可變區(MFXXXX)和輕鏈可變區的 CDRs 之胺基酸序列以及共同輕鏈可變區的胺基酸序列。

(4)

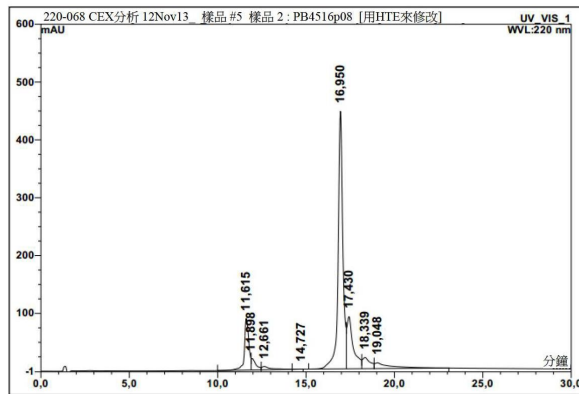


【圖1】

(5)

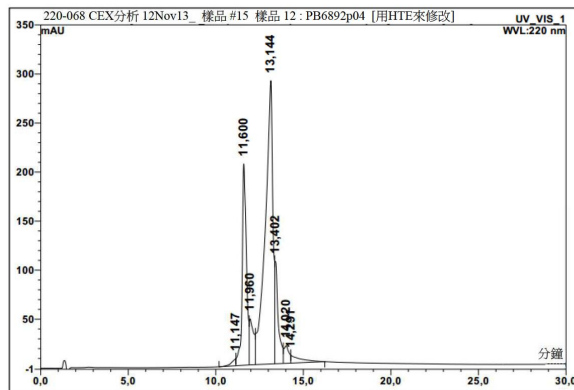
PB4516p08 (MF3755 x MF3178)

圖片A



PB6892 (MF3755 x MF1849)

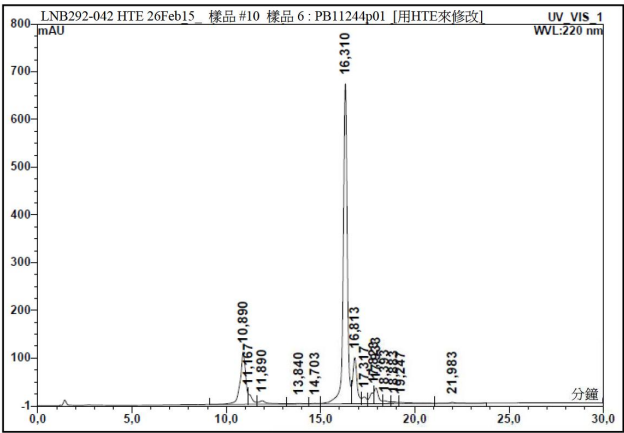
圖片B



【圖2】

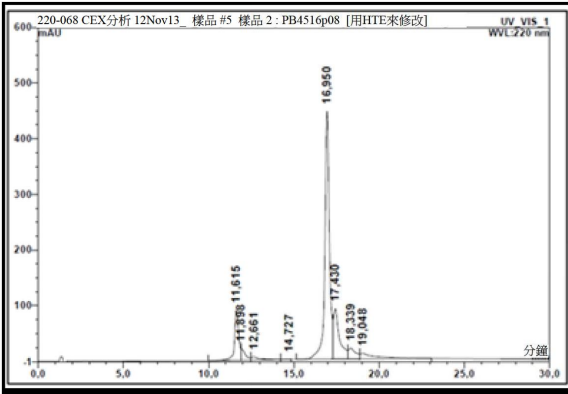
(6)

PB4516p10 (MF3755 x MF3178)



【圖3a】

PB11244p01 (MF3755 x MF2032)



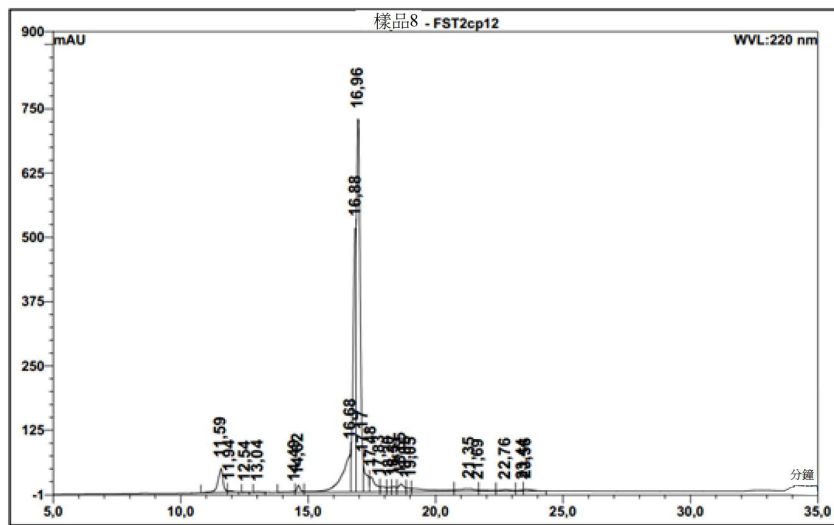
【圖3b】

PB	標靶 1	VH pI	標靶 2	VH pI	平均 VH pI T1, T2	配對之間的 VH pI值差異
PB11244	EGFR – MF3755-DE	6.09	HER2 – MF2032-KK	9.33	7.71	0.08
PB4516	EGFR – MF3755-DE	6.09	HER3 – MF3178-KK	9.17	7.63	

【圖3c】

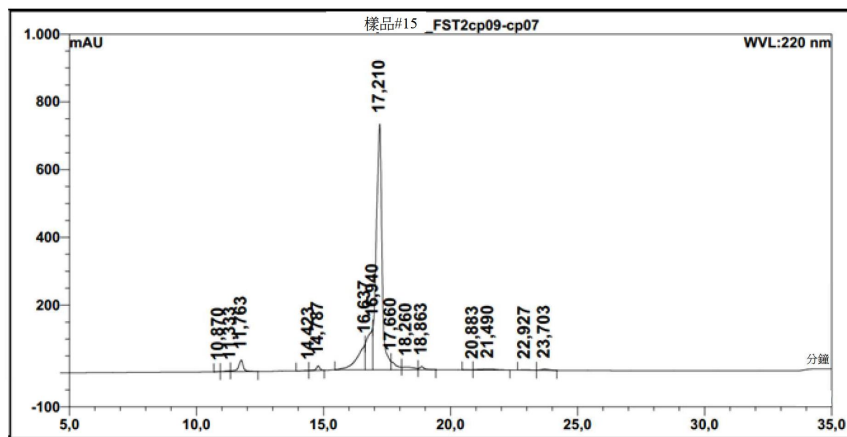
(7)

PB4516和PB11244的共洗提



【圖4】

PB4516和PB11244的共洗提



【圖5】

(8)

MF	PG	滯留時間
MF3178	PG3178	22.282
MF3958	PG3958	12.208
MF4003	PG4003	12.983
MF3163	PG3163	21.706
MF6061	PG6061	24.000
MF6930	PG6930	12.393
MF6256	PG6256	10.333
MF3755	PG3755	11.123
MF1898	PG1898	17.125
MF2032	PG2032	21.760

【圖6】

PB	標靶 1	VH pI	標靶 2	VH pI	平均 VH pI T1, T2	總 PB pI	配對之間的 VH pI值差異	總PB pI 值的差異	滯留時間
PB4188	HER3 – MF3178-KK	9.17	HER2 – MF3958-DE	8.55	8.86	8.52	0.035	0.01	18.99
PB4528	HER3 – MF3178-KK	9.17	EGFR – MF4003-DE	8.62	8.895	8.53			19.53
PB4522	HER3 – MF3178-KK	9.17	EGFR – MF4280-DE	4.73	6.95	8.07	0.08	0.09	16.24
PB11003	HER3 – MF6061-KK	9.33	EGFR – MF4280-DE	4.73	7.03	8.16			16.48
PB14120	PD1 – MF6930-KK	6.54	TIM3 – MF6501-DE	5.21	5.875	8.07	0.01	0	11.37
PB14125	PD1 – MF6256-KK	6.52	TIM3 – MF6501-DE	5.21	5.865	8.07			11.4
PB6892	HER2 – MF1849-KK	8.55	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.32	8.24	0.045	0	13.21
PB14063	LGR5 – MF7423-KK	8.64	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.365	8.24			13.48
PB11243	EGFR – MF3755-DE	6.09	HER2 – MF1898-KK	9.2	7.645	8.37	0.625	0.21	13.9
PB14068	LGR5 – MF7428-KK	7.95	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.0	8.16			13.98
PB11243	EGFR – MF3755-DE	6.09	HER2 – MF1898-KK	9.2	7.645	8.37	0.28	0.13	13.9
PB14063	LGR5 – MF7423-KK	8.64	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.365	8.24			14.12
PB14325	LGR5 – MF7533-KK	9.01	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.55	8.31	0.16	0.12	16.22
PB11244	EGFR – MF3755-DE	6.09	HER2 – MF2032-KK	9.33	7.71	8.43			16.31
PB6892	HER2 – MF1849-KK	8.55	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.32	8.24	0.3	0.08	13.21
PB14068	LGR5 – MF7428-KK	7.95	EGFR – MF3755-DE	6.09	7.02	8.16			13.21

【圖7】

(9)

藉由MF編號序列辨識編號：1-21而被表明之各種不同的可變領域之重鏈可變區以及序列辨識編號：22-27之CDRs和輕鏈可變區的胺基酸序列

序列表概要

1	HER3-MF3178	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSY WGFQYWGQGLTLTVSS
2	HER3-MF3163	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCAKDSYSRHFYSW WAFDYWGQGLTLTVSS
3	HER3-MF6061	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPQ SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSY WGFQYWGQGLTLTVSS
4	PD1-MF6930	EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSNYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPIV FETATYAEKKFQGRVTIIADKSTSTVYMELESLRSEDAVYYCARGTVEATLLFD YWGQGLTLTVSS
5	PD1-MF6256	EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSNYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPIV FDTSSYEKKFQGRITIIADKSTSTVYLESLRSEDAVYYCARGTVEATLLFD FWGQGLTLTVSS
6	HER2-MF1849	QVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSNYVISWVRQAPGQGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYA FDYWGQGLTLTVSS
7	LGR5-MF7423	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPI LGTTDHAQKFQDRVTITAGKSSNTAYMDLSLRSDDTAVYYCARERIAARLDYF DSWGQGLTLTVSS
8	EGFR-MF3755	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNVRQAPGHGLEWMGINAN TGDPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHFD YWGQGLTLTVSS
9	LGR5-MF7428	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPI LGTTDHAQKFQDRVTITADKSSKTTYMELNSLRSDDTAVYYCARELIAARLDYF DSWGQGLTLTVSS
10	LGR5-MF7533	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPI LGTTDHAQKFQDRVTITAGKSSNTAYMDLSLRSDDTAVYYCARERIAARLDYF DSWGRGTLTVSS
11	LGR5-MF7532	EVQLVQSGSKLKKPGASVKVSKASGYTFTSYTMNVRQAPGQGLEWMGWINTD TGDPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQINSLKAEDTAVYYCARGDCDSTSCYR YSYGYEDYWGRTLVTVSS
12	EGFR-MF4280	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHVVRQAPGQGLEWMGGFDPE YKTFFAQNFQGRVTMTEDTSADTAYMELSLRSEDATAVYYCATEGYETTTY YNLFDSWGQGLTLTVSS
13	HER2-MF3958	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPG SGYTSYAEKFQGRATLTADESTAYMELSLRSEDATAVYFCARPPVYDSAWF AYWGQGLTLTVSS
14	EGFR-MF4003	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTFSPFAMNLRQAPGQGLEWMGWITTN TGDPTYAQGFSGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYNWIRGFDY WGQGLTLTVSS
17	HER2-MF3025	QVQLKQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTGYINWVKRFGQGLEWIARIYPG SGYTYNEKFKGKATLTAEESNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYF AVWGTGTTTVTVSS
18	EGFR-MF4010	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNNAMNVRQAPGQGLEWMGWINTI

【圖8】

		TGDPSYAQGFTGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREEFLEWLFDD YWGQGTLLTVSS
19	TIM3-MF6501	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SNAWDSMAF DYWGQGTLLTVSS
20	HER2-MF1898	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGFRRTTSLG FDYWGQGTLLTVSS
21	HER2-MF2032	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYRRTARAG FDYWGQGTLLTVSS

22	VL CDR1	QSISSY
23	VL CDR2	AASSLQS
24	VL CDR3	QSYSTP
25	IgVk1-39*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP
26	共同輕鏈 IgKV1*39/jk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYSTPPITFGQGTKVEIK
27	共同輕鏈 IgKV1*39/jk5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYSTPPITFGQGTKLEIK
28	IgG1 CH1 鉸鏈	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKHTCPCCP
29	IgG1 CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AK
30	IgG1 CH3 KK	GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	IgG1 CH3 DE	GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【圖8】(續)