

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-516103

(P2017-516103A)

(43) 公表日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

F I

G01N 33/53 Z N A N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2016-567597 (P2016-567597)	(71) 出願人	514232085 ユーシービー バイオファルマ エスピー アールエル ベルギー国 1070 ブリュッセル ア レ デ ラ レシエルシエ 60
(86) (22) 出願日	平成27年5月8日 (2015.5.8)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月11日 (2017.1.11)	(72) 発明者	シルヴァ、ジョン イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユセベ セルテック、 アイピーディー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/060179	(72) 発明者	ヴェテルレイン、オリヴィア イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユセベ セルテック、 アイピーディー
(87) 国際公開番号	W02015/173135		
(87) 国際公開日	平成27年11月19日 (2015.11.19)		
(31) 優先権主張番号	14168317.7		
(32) 優先日	平成26年5月14日 (2014.5.14)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体特異性を決定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、抗体の特異性多価抗体が単一特異性か否か、特に、二価抗体が単一特異性または二価特異性か否かを決定するための方法に関する。さらに、本発明は、サンプルに存在する二重特異性二価抗体の量を定量化する方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下のステップを含む、二価抗体のサンプルが、可変領域 1 ( V R 1 ) および可変領域 2 ( V R 2 ) を有する任意の二重特異性抗体を含むか否かを決定するためのインビトロでの方法：

a ) 抗原の半分は、第 1 の検出可能なマーカー ( M 1 ) を有し、他の半分は、第 2 の検出可能なマーカー ( M 2 ) を有する V R 1 に特異的に結合する抗原を添加するステップ；および

b ) サンプルが、M 1 と M 2 の両方が特異的に結合される抗体を含むか否かを決定するステップ；

ここで、M 1 および M 2 が結合される抗体が検出される場合、サンプルは、二重特異性抗体を含む、上記方法。

**【請求項 2】**

以下のステップを含む、サンプルにおいて、可変領域 1 ( V R 1 ) および可変領域 2 ( V R 2 ) を有する、二重特異性二価抗体の量を定量化するためのインビトロでの方法：

a ) 抗体が、V R 1 のみを有する単一特異性である参照サンプル、および二重特異性抗体が未知である試験サンプルを提供するステップ；

b ) 各サンプルに対して、抗原の半分は、第 1 の検出可能なマーカー ( M 1 ) を有し、他の半分は、第 2 の検出可能なマーカー ( M 2 ) を有する V R 1 に特異的に結合する抗原を添加するステップ；および

c ) M 1 と M 2 の両方が、各サンプルにおいて、特異的に結合される抗体の量を決定するステップ、および

d ) 参照および試験サンプルにおいて、M 1 または M 2 の量を比較するステップ。

**【請求項 3】**

以下のステップを含む、二価単一特異性抗体 ( A b 1 ) の F a b アーム置換を定量化するためのインビトロでの方法：

a ) F a b アーム置換が起こることができるような条件下で、少なくとも第 2 の抗体を有する抗体 ( A b 1 ) をインキュベートするステップ；および

b ) 請求項 2 の方法に係る生じた二価抗体の量を定量化するステップ。

**【請求項 4】**

分析される二価抗体が、I g G 4 である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5】**

M 1 と M 2 の両方が結合される抗体の量の決定が、M 1 をマトリクスに結合させること、および抗体に結合され、マトリクスによって捕捉される M 2 の量を測定することによって実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

M 2 が、電気化学発光マーカーである、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

ステップ a ) が、血漿中で実施される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 8】**

血漿は内因性 I g G 4 s が枯渇し、抗体 ( A b 1 ) および第 2 の抗体が添加された、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

ステップ a ) が、グルタチオン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトールまたはトリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン、およびそれらの組み合わせの中から選択される還元剤の存在下で実施される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 10】**

チオール基を不活性化することによって、ステップ a ) 後の F a b アーム置換を防止することを含む、請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 11】**

10

20

30

40

50

前記不活性化が、アルキル化剤を添加することによって実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記アルキル化剤は、N - エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、ヨード酢酸、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

以下のステップを含む、別の定量化を実施することをさらに含む、請求項 3 ~ 12 のいずれかに記載の方法：

a 2) F a b アーム置換が発生することができるような条件下で、第 2 の抗体 ( A b 2 ) と一緒に抗体 ( A b 1 ) をインキュベートするステップ；

b 2) 抗体は、V R 1 のみを有する単一特異性である参照サンプル、および a 2) から生じた試験サンプルを提供するステップ；

c 2) 50% は、A b 1 に対して特異的で M 1 に結合された抗原 1 ( A g 1 ) であり、50% は、A b 2 に対して特異的で M 2 に結合された抗原 2 ( A g 2 ) である、抗原分子の混合物を添加するステップ；および

d 2) M 1 と M 2 の両方が特異的に結合される抗体の量を決定するステップ。

【請求項 14】

c 2) でのその参照サンプルに対する M 2 シグナルの増加は、請求項 5 で測定される M 2 シグナルの損失に相関する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

参照サンプルは、ステップ a) が、F a b アーム置換が発生できないような条件下で実施される方法を実施することによって得られる、請求項 3 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多価抗体が単一特異性であるか否か、特に、二価抗体が単一特異性または二重特異性であるか否かを決定するための方法に関する。本発明は、サンプルにおいて、二重特異性二価抗体の量を定量化するための方法にさらに関連し、より特異的には、本発明は、抗体の F a b アーム置換を定量化するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

免疫グロブリン G ( I g G ) は、ヒト血清中で最も豊富な抗体 ( A b ) であり、4 つのサブクラスに細分される：I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4。I g G 1 および I g G 4 の両方は、2 つの中間ヒンジジスルフィド結合を有し、I g G 2 は、4 つの中間ヒンジジスルフィド結合を有し、I g G 3 は、1 1 の中間ヒンジジスルフィド結合を有する。I g G 1 および I g G 3 は、それらが、抗体依存性細胞媒介細胞毒性および補体依存性細胞媒介細胞毒性を引き起こすので、一般的に、活性サブクラスとして記載される。逆に、I g G 2 および I g G 4 が、それらが、エフェクター分子に不完全に結合し、比較的低いエフェクター機能誘導を生じるので、不活性なサブクラスとして記載される。

【0003】

治療の設定において、抗体の選択は、一般的に、異なる抗体サブクラスに関連する異なる特性によって左右されている。I g G 抗体は、一般的に、免疫エフェクター機能の補充が望まれない選択のサブクラスであり、治療効果は、例えば、接合されるエフェクター分子の受容体遮断または標的化送達を介して達成される。

【0004】

I g G サブクラスの中で、I g G 4 分子は、「半分子置換」または「F a b アーム置換」( F A E ) として知られる動的なスワッピングイベントを受けることができるユニークな特徴を有する。この生理学的プロセスは、1 つの I g G 4 抗体の重 - 軽鎖対 ( 半分子 )

と、もう1つのIgG4抗体の重-軽鎖対(半分子)との置換および組換えを含む。この効果は、還元特に影響を受けやすい重鎖間のジスルフィド結合を生じさせる異常なヒンジ配列の存在による。さらに、IgG4 CH3ドメインは、IgG1抗体と比べて、より安定性の低いホモ二量体を形成し、またその置換を促進する(Aalbersら、2009年)。

#### 【0005】

Fabアーム置換を受ける二価、単一特異性IgG4抗体のこの固有の能力は、二価、二重特異性抗体、すなわち、異なる抗原に対して各アームと結合し、したがって、同一抗原を架橋できない抗体の形成を生じる。異なる、未知の可変領域を有する抗体間で生じる置換は、未知で、そしておそらく望ましくない特異性を有する二重特異性抗体を生じる。さらに、内因性IgG4抗体とのFabアーム置換を受ける生物治療的二価、単一特異性IgG4抗体は、置換される二価ではあるが、機能的には一価で、二重特異性の抗体の形成を生じることができ、これは、標的抗原に結合する場合、親和性の損失を生じる。これは、薬物動態および生物治療的有効性に影響を与え、非架橋の挙動に対して元の標的抗原の相同的架橋を変え得る。その後、Fabアーム置換は、ヒト免疫療法にとって望ましくない薬力学的予測不可能性をもたらし得る。したがって、Fabアーム置換に関するIgG4抗体の傾向は、生物学的治療薬のためのバックボーンとして、もしそうでなければ不活性であったIgG4アイソタイプの使用を可能にするためのものであると理解されなければならない。したがって、サンプルでの二重特異性二価抗体の量を定量化し、抗体、特に、IgG4抗体に対するFabアーム置換を測定(定量化)するために、一価抗体が単一特異性であるか否か、二価抗体が単一特異性または二価特異性であるか否かを決定するためのアッセイを提供するための当該技術分野での必要性がある。

10

20

#### 【0006】

この意味において、van der Neut Kofschotenら、2007年は、抗イデオタイプ抗体を使用して、抗CD20 IgG4と抗EGFR IgG4の間のFabアーム置換の測定を可能にしたサンドイッチELISAアッセイを記載した。

#### 【0007】

2011年に、Shapiroらはまた、ELISAアッセイに基づいて、内因性IgG4との抗4 IgG4のFabアーム置換を決定するための方法を報告した。

30

#### 【0008】

上記にもかかわらず、抗体のFabアーム置換を定量化するための信頼できる方法を提供するさらなる改善された方法のための当該技術分野での必要性がある。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1】図1: SDS-PAGEおよびクマシール染色による抗体分析。各抗体の当量は、変性、非還元性SDS-PAGEおよびクマシール染色によって分析された。各抗体のアイソタイプ、特異性およびヒンジ配列(野生型またはS228P変異)は、上記に記載される。白抜き矢印は、無傷の、完全長抗体の位置を示し;黒塗り矢印は、半分子の位置を示す。抗IL-6臨床候補S228P IgG4調製における検出可能な半分子が存在しないことに留意すべきである(レーン2)。タンパク質マーカーの位置および分子量は、左側に示される。

40

#### 【0010】

【図2】図2: Fabアーム置換。A、インビトロFAEの略図および本発明のアッセイ。: サンプルは、2つの異なる検出可能なマーカーの1つまたはもう1つに結合される同じ抗原分子の混合物とインキュベートされる。16時間のインキュベーションのシグナルの損失は、FAEが起こったことを推察する(方法1)。同時に、サンプルは、異なる検出可能なマーカーにそれぞれ結合される2つの異なる抗原の混合物とインキュベートされる。16時間のインキュベーション後のシグナルの獲得は、FAEから生じる新たに形成された二重特異性抗体の存在を推察する(方法2)。ライトグレーのY形状、抗IL-6(野生型またはS228P)抗体;濃いグレーのY形状、抗TNF野生型抗体;黒の壊れ

50

た楕円、新たに形成された二重特異性（抗IL-6/抗TNF）抗体を強調する；黒の実線、ストレプトアビジン被覆メソスケールディスクバリー（Meso Scale Discovery）（MSD）プレート；ライトグレーの円、ビオチン化IL-6；ライトグレーダイアモンド、Sulfo-tag（登録商標）標識IL-6；濃いグレーのダイアモンド、Sulfo-tag（登録商標）標識TNF；巻き矢印、発生したシグナルを示す。BおよびC、2つのMSDベースの方法によって、インビトロでFAEを定量化および検出する。さらなるFAEを防止するGSHの存在下または非存在下で、37℃で、一晚インキュベーション前または後の急冷された抗体サンプル（それぞれ、T=0およびT=16時間）は、Aで示される2つのアッセイによって分析された。ライトグレーの斜線の棒、サンプルを含む抗IL-6野生型IgG4抗体；濃いグレーの斜線の棒、サンプルを含む抗IL-6 S228P IgG4抗体。注：GSHの存在下でインキュベートされた抗IL-6野生型抗体および抗TNF野生型IgG4抗体は、方法1によるアッセイの場合（B）、シグナルの損失を示し、および方法2によるアッセイの場合（C）、シグナルの関連する獲得を示す。データポイントは、3つの独立した測定の平均±SEM値を表す。\* P < 0.05、対応のあるt-検定。

10

#### 【0011】

【図3】図3：IgG枯渇生理学的マトリクスの調製および分析。A、内因性IgG4抗体を枯渇するために用いられる抗IgG4（および対照）ビーズを使用するプロセスの概略図。血液を遠心分離した後、続いて、血漿の当量（負荷）を、2つの抗IgG4カラム（左側）に、または並行して2つの対照カラム（右側）に入れた。各ランからの非結合、フロースルー（FT）材料は、ビーズが洗浄され、SDS-PAGEサンプル緩衝液（それぞれ、E1およびE2）で溶出される前に、回収された（それぞれ、FT1およびE2）。抗IgG4ビーズからのFT2は、直接使用されたか（IgG4枯渇血漿）、またはIgG4枯渇血液を得るために、使用前に、洗浄赤血球（RBC）に加えられたかのいずれかであった。B、SDS-PAGE、WBおよびクーマシー染色によって得られたサンプルの分析。（Aからの）サンプルは、SDS-PAGEおよびHRP接合抗IgG4、1、2および3Fc特異的抗体とのWBによって分析された（主な画像の左側に記載）。黒塗り矢印、半分子の位置を示す（抗IgG4抗体との免疫反応性のみ）。抗IgG4ビーズとのインキュベーションからの画分E1およびE2は、結合され（E合計）、SDS-PAGEおよびクーマシー染色によって分析された（右側の画像）。タンパク質マーカ-の位置および分子量を、右側に示す。

20

30

#### 【0012】

【図4】図4：ex vivo IgG4枯渇生理学的マトリクスにおけるFAEの分析。AおよびB、サンプルを含む抗IgG4野生型抗体（ライトグレーの斜線の棒）またはそのS228P修飾変異体（ダークグレーの斜線の棒）は、GSHの存在下または非存在下で、IgG4枯渇血液（左側）またはIgG4枯渇血漿（右側）のいずれかにおいて1：9のモル比で、抗TNF野生型IgG4抗体とインキュベートした。37℃で一晩インキュベーション後、サンプルを急冷し、本発明の方法によって、FAEについて分析した。A、サンプルは、2つの異なる検出可能なマーカ-の1つまたはもう1つに結合される同じ抗原分子の混合物とインキュベートされる（方法1）。B、サンプルは、異なる検出可能なマーカ-にそれぞれ結合される2つの異なる抗原の混合物とインキュベートされる（方法2）。注：生理学的関連のインビトロ還元条件の下で、すなわち、補充GSHの非存在下で、FAEのみが、血漿中ではなく血液中で発生する。データポイントは、3つの独立した測定の平均±SEM値を表す。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、対応のあるt-検定。

40

#### 【0013】

【図5】図5：2つの投与された対象の総および無傷のS228P抗IL-6抗体血漿濃度-時間プロファイル。健康なボランティアは、S228P抗IL-6抗体の3mg/kg静脈内投与を与えられた。血漿サンプルを定期的に採取し、2つの別個の方法によって分析した。総アッセイ；全ての単一特異性、一価S228P抗IL-6抗体半分子（すな

50

わち、非置換または交換種)を検出する。無傷の(i n t a c t)アッセイ;完全なサイズ、単一特異性、二価S 2 2 8 P抗I L 6抗体分子のみ(すなわち、非置換種のみ)を検出する。黒矢印、S 2 2 8 P抗I L - 6抗体投与を示す。黒のプロファイル、総アッセイ;グレイのプロファイル、無傷のアッセイ;半減期、( t 1 / 2 )。

【発明を実施するための形態】

【0014】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、多価抗体が、単一特異性であるか否か、特に、二価抗体が、単一特異性または二重特異性であるか否かを決定するための新規方法を提供することによって、上記の要求に対処するものである。本発明は、サンプル中の二重特異性二価抗体の量を定量化するための新規方法、より具体的には、抗体のF a bアーム置換を定量化するための方法をさらに提供する。

10

【0015】

第1の態様において、本発明は、二価抗体のサンプルが、可変領域1(V R 1)および可変領域2(V R 2)を有する任意の二重特異性抗体を含むか否かを決定するためのインビトロ方法を提供し、これは以下のステップを含む:

a) 抗原の半分は、第1の検出可能なマーカー(M 1)を有し、他の半分は、第2の検出可能なマーカー(M 2)を有するV R 1に特異的に結合する抗原を添加するステップ; および

b) サンプルが、M 1とM 2の両方が特異的に結合される抗体を含むか否かを決定するステップ;

20

ここで、サンプルは、M 1およびM 2が結合される抗体が検出される場合、二重特異性抗体を含む。

【0016】

第2の態様において、本発明は、サンプルにおいて、可変領域1(V R 1)および可変領域2(V R 2)を有する、二重特異性二価抗体の量を定量化するためのインビトロ方法を提供し、これは以下のステップを含む:

a) 抗体が、V R 1のみを有する単一特異性である参照サンプル、および二重特異性抗体が未知である試験サンプルを提供するステップ;

b) 各サンプルに対して、抗原の半分は、第1の検出可能なマーカー(M 1)を有し、他の半分は、第2の検出可能なマーカー(M 2)を有するV R 1に特異的に結合する同じ抗原を加えるステップ; および

30

c) M 1とM 2の両方が、各サンプルにおいて特異的に結合される抗体の量を決定するステップ、および

d) 参照および試験サンプルにおいて、M 1またはM 2の量を比較するステップ。

【0017】

第3の態様において、本発明は、二価単一特異性抗体(A b 1)のF a bアーム置換を定量化するためのインビトロ方法を提供し、これは以下のステップを含む:

a) F a bアーム置換が起こることができるような条件下で、抗体(A b 1)を少なくとも第2の抗体とともにインキュベートするステップ; および

40

b) 第2の態様の方法に係る生じた二価抗体の量を定量化するステップ。

【0018】

本発明の第4の態様において、本発明の第1および第2の態様の二価抗体、または本発明の第3の態様に係る抗体(A b 1)は、I g G 4である。代替の態様において、本発明の方法の第3の態様に係る第2の抗体は、I g G 4である。第3の態様に係る本発明の方法のさらなる態様において、抗体A b 1および第2の抗体の両方は、I g G 4である。当業者が理解するように、本発明の第3の態様に係る方法は、任意の抗体サブクラスのF a bアーム置換を確立するために、使用されうる。これは、遺伝子操作された突然変異を含む抗体の開発という文脈において、特に関連するものであり、特に、これらの突然変異は、抗体でのヒンジ領域またはC H 3 - C H 3インターフェイスに影響を与える。

50

## 【0019】

本発明の方法の第5の態様において、M1とM2の両方が結合される抗体の量の決定が、M1をマトリクスに結合させ、抗体に結合され、マトリクスによって捕捉されるM2の量を測定することによって実施される。

## 【0020】

本発明の方法の第6の態様において、M2は、電気化学発光マーカである。

## 【0021】

本発明の第7の態様において、第3の態様に係るFabアーム置換を定量化するための方法は、ステップa)が、血漿中で実施されることを特徴とする。

## 【0022】

本発明の第8の態様において、Fabアーム置換を定量化するための方法は、前記血漿は、内因性IgG4が枯渇し、抗体(Ab1)および第2の抗体(Ab2)が追加されていることを特徴とする。

## 【0023】

当該技術分野で以前に記載されているように、血液または血漿などの生理学的マトリクスは、Fabアーム置換が生じる自然な還元的環境を提供する。しかしながら、インピトロ状況で、典型的に、還元剤の添加によって、そのような環境などを提供する必要がある。当業者は、サンプルの酸化還元電位を制御することができる代替手段を認識しており、したがって、そのような環境を提供する。

## 【0024】

本発明の第9の態様において、前記ステップa)が、グルタチオン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトールまたはトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、およびそれらの組み合わせの中から選択される還元剤の存在下で実施される。

## 【0025】

Fabアーム置換が発生すると、当業者は、さらなるFabアーム置換が起こることを防止しようと望むかもしれない。当業者であれば知っているように、抗体間のFabアーム置換がサンプルを凍結することによって、例えば、-20で貯蔵することによって、または抗体上に存在するチオール基を不活性化することによって、防止されうる。

## 【0026】

本発明の第10の態様において、本発明の第3の態様に係るFabアーム置換を定量化するための方法は、チオール基を不活性化することによるステップa)後のFabアーム置換を防止することをさらに含む。

## 【0027】

本発明の第11の態様において、前記不活性化は、アルキル化剤を添加することによって実施される。

当業者に公知のアルキル化剤の例としては、N-エチルマレイミド(NEM)、ヨードアセトアミド(IAM)、ヨード酢酸(IAA)、アクリルアミド、2-ビニルピリジン、または4-ビニルピリジンが挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0028】

本発明の第12の態様において、前記アルキル化剤は、N-エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、ヨード酢酸、およびそれらの組み合わせから選択される。

## 【0029】

本発明の第13の態様において、本発明の第3の態様に係るFabアーム置換を定量化するための方法は、以下のステップを含む別の定量化を行うことをさらに含む：

a2) Fabアーム置換が発生することができるような条件下で、第2の抗体(Ab2)と一緒に抗体(Ab1)をインキュベートするステップ；

b2) 抗体は、VR1のみを有する単一特異性である参照サンプル、およびa2)から生じる試験サンプルを提供するステップ；

c2) 50%は、Ab1に対して抗原1(Ag1)特異的であり、M1に結合され、50%は、Ab2に対して抗原2(Ag2)特異的であり、M2に結合される抗原分子の混

10

20

30

40

50

合物を添加するステップ；および

d 2) M 1 と M 2 の両方が特異的に結合される抗体の量を決定するステップ。

【0030】

本発明の第3の態様に係る F a b アーム置換を定量化するための方法の第14の態様において、c 2) でのその参照サンプルに対する M 2 シグナルの増加は、本発明の第5の態様で測定される M 2 シグナルの損失に相関する。

【0031】

当業者であれば理解できるように、第1の定量化でのシグナルの損失と第2の定量化でのシグナルの獲得の間のこの相関により、新たに形成された二重特異性抗体の存在の確認をすることができる。

【0032】

本発明の第15の態様において、本発明の第3の態様の方法に係る参照サンプルは、ステップ a) が、F a b アーム置換が生じることができないような条件下で実施される方法を実施することによって得られる。

【0033】

実験的な観点から実用的な目的のために、参照サンプルが、両方の抗体との接触後すぐに得られる場合、得られたサンプルからの測定は、時間 = 0 と考えられる。

【0034】

本発明の特定の態様において、F a b アーム置換を定量化するための方法において、アッセイを測定するために使用される検出可能なマーカーのいずれかは、放射性マーカー、蛍光マーカー、酵素マーカー、発光性等である。当業者は、本発明の方法に有用な他のマーカーを知っているだろう。

【0035】

本発明に係る F a b アーム置換を定量化するための方法のさらなる特定の態様において、ステップ a) は、20 ~ 42、好ましくは、30 ~ 38、好ましくは、35 ~ 38、および好ましくは、37 の温度で実施される。

【0036】

本発明に係る F a b アーム置換を定量化する方法のさらなる特定の態様において、抗体 (A b 1) は、所定の時間の間、少なくとも1つの他の抗体と接触される。一般的に、生理学的範囲内で、そのような反応が起こるのに必要な時間の量は、温度に反比例し、温度がより低ければ低いほど、より反応速度が遅い。所定の温度で最高の反応時間、逆に、所定の時間枠に対して理想的な温度を確立することは、当業者にとって日常的である。特定の態様において、この時間は、好ましくは、2時間 ~ 48時間、4時間 ~ 40時間、8時間 ~ 26時間、10時間 ~ 24時間、好ましくは、12時間 ~ 20時間、および好ましくは、16時間 ~ 18時間である。

【0037】

本発明に係る F a b アーム置換を定量化するための方法のさらなる特定の態様において、還元剤は、グルタチオンであり、好ましくは、0.01 mM ~ 10 mM、好ましくは、0.01 mM ~ 5 mM、好ましくは、0.02 mM ~ 3 mM、好ましくは、0.2 mM ~ 0.8 mM、好ましくは、0.3 mM ~ 0.7 mM、および好ましくは、0.5 mM の濃度で存在する。当業者は、他の還元剤を使用する場合、必要相当の濃度を日常的に確立するだろう。

【0038】

本発明のさらなる特定の態様において、検出可能なマーカー M 1 は、M 1 に対して特異的な抗体を介して、マトリクスに結合される。

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体 (単数)」または「抗体 (複数)」は、モノクロナール抗体またはポリクロナール抗体を指す。本明細書中で使用される場合、用語「抗体 (単数)」または「抗体 (複数)」は、当該技術分野で公知のような組換え技術によって生成される組換え抗体が挙げるが、それらに限定されない。「抗体 (単数)」または

10

20

30

40

50

「抗体（複数）」は、任意の種の抗体、特に、哺乳動物種の抗体を包含するが、例えば； I g A 1、I g A 2、I g D、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、I g G 4、I g E および I g M およびそれらの修飾された変異体を含む任意のアイソタイプのヒト抗体、例えば、チンパンジー、ヒヒ、アカザルまたはカニクイザルからの非ヒト霊長類抗体；例えば、マウス、ラット、ウサギからのげっ歯類抗体；ヤギまたは馬の抗体；およびラクダ科の動物の抗体（例えば、ナノボディ T M ( N a n o b o d i e s T M ) などのラクダまたはラマからの) およびそれらの誘導體；または鶏抗体などの鳥種またはサメ抗体などの魚種の抗体を含む。

#### 【 0 0 4 0 】

用語「抗体（単数）」または「抗体（複数）」はまた、少なくとも1つの重鎖および/または軽鎖抗体配列は、第1の種からであり、および重鎖および/または軽鎖抗体配列の第2の部分は、第2の種からである「キメラ」抗体を指す。本明細書中で目的のキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザルまたはカニクイザルなどの旧世界ザル）由来の変域ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体に由来する配列を含むキメラ抗体である。大部分にとって、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および活性を有するマウス、ラット、ウサギ、鶏などの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の超可変領域 [ または相補性決定領域 ( C D R ) ] からの残基によって置換されるヒト抗体（レシピエント抗体）である。ほとんどの場合、C D R のヒト（レシピエント）抗体の外側の残基は；すなわち、フレームワーク領域 ( F R ) において、対応する非ヒト残基によって、さらに置換される。

10

20

#### 【 0 0 4 1 】

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中でまたはドナー抗体中で検出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに洗練するために行われる。ヒト化は、ヒトでの非ヒト抗体の免疫原性を低下させ、したがって、ヒト疾患の治療への抗体の適用を容易にする。それらを生成するヒト化抗体およびいくつかの異なる技術は、当該分野で周知である。用語「抗体（単数）」または「抗体（複数）」はまた、ヒト抗体を指し、それは、ヒト化に代わるものとして、生成されることができる。例えば、免疫化の際に、内因性マウス抗体の産生の非存在下で、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが可能である。例えば、キメラおよび構造遺伝子突然変異マウスにおいて、抗体重鎖結合領域 ( J H ) 遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような構造遺伝子突然変異マウスにおけるヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイの転移は、前記抗原とのヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物の免疫化の際に、特定の抗原に対して特異性を有するヒト抗体の産生をもたらす。そのようなトランスジェニック動物を産生するための技術およびそのようなトランスジェニック動物からヒト抗体を単離および産生するための技術は、当該分野で公知である。

30

#### 【 0 0 4 2 】

また、トランスジェニック動物、；例えば、マウスにおいて、マウス抗体の変域領域をコードする免疫グロブリン遺伝子のみは、対応するヒト可変免疫グロブリン遺伝子配列で置換される。抗体定常領域をコードするマウス生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子は、変更されないままである。このようにして、トランスジェニックマウスの免疫系での抗体エフェクター機能および結果としてB細胞の成長は、本質的に不変であり、これは、インビボで抗原投与の際に、改善された抗体反応を導き得る。目的の特定の抗体をコードする遺伝子は、そのようなトランスジェニック動物から単離されると、定常領域をコードする遺伝子は、完全なヒト抗体を得るために、ヒト定常領域遺伝子で置換されることができる。インビトロでヒト抗体/抗体断片を得るための他の方法は、ファージ提示法またはリボソーム提示法技術のような提示技術に基づき、ここで、組換えDNAライブラリーが使用され、これは、人工的に少なくとも部分的に生成されるか、またはドナーの免疫グロブリン可変 ( V ) ドメイン遺伝子レパートリー由来のいずれかである。ヒト抗体を生成するための

40

50

ファージおよびリボソーム提示法技術は、当該分野で周知である。ヒト抗体はまた、目的の抗原で *ex vivo* 免疫される単離されたヒト B 細胞から生成され、続いて、最適なヒト抗体についてスクリーニングされることが出来るハイブリドーマを生成するために融合され得る。本明細書中で使用される場合、用語「抗体（単数）」または「抗体（複数）」はまた、非グリコシル化抗体を指す。

【0043】

本発明の特定の態様において、抗体は、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレングリコール）とポリ（プロピレングリコール）のコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）またはポリ（プロリン）などの水溶性ポリマーなどの官能部分の共有結合によって修飾される抗体であり、これらの全ては、対応する非修飾タンパク質よりも静脈内注射後の血液中で実質的に長い半減期を示すことが知られている。

10

【0044】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分などの官能部分に結合する抗体である。1つの特定の態様において、抗体は、抗体断片であり、PEG分子は、抗体断片に位置する任意に利用可能なアミノ酸側鎖または末端アミノ酸官能基、例えば、任意の遊離アミノ、イミノ、チオール、水酸基またはカルボキシル基を介して結合され得る。そのようなアミノ酸は、抗体断片中に自然に発生するか、または組換えDNA方法を使用してその断片中に操作され得る（例えば、US 5, 219, 996; US 5, 667, 425; WO 98/25971 参照）。

20

【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体（単数）」または「抗体（複数）」は、ヒト（例えば、IgG）および他の哺乳動物種由来を含む任意の種の非切断抗体だけではなく、抗体断片も指す。抗体の断片は、当該分野で知られているような少なくとも1つの重または軽鎖免疫グロブリンドメインを含み、1つ以上の抗原（複数可）に結合する。本発明に係る抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvおよびscFv断片；ならびに抗体断片または抗体から形成されるダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ドメイン抗体、単鎖抗体、二重特異性、三重特異性、四重特異性または多重特異性抗体が挙げられ、Fab-Fv構成を含むが、これに限定されない。上記で定義されるような抗体断片は、当該分野で公知である。

30

【0046】

本明細書中で使用される場合、用語「二価抗体」は、2つの抗原結合部位を有する抗体を意味する。

【0047】

本明細書中で使用される場合、用語「単一特異性抗体」は、同一可変領域を含む抗体を意味する。

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「二重特異性抗体」は、2つの異なる可変領域を含む抗体を意味する。

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「Fabアーム置換」または「FAE」は、1つの抗体の1つの完全な重-軽鎖対（半分子）と別の抗体の重-軽鎖対（半分子）との置換および組換えを意味する。IgG4抗体は、Fabアーム置換を最も受けやすい。

40

【0050】

本明細書中で使用される場合、用語「Fabアーム置換が起こることができるような条件」は、1つの抗体の重-軽鎖対（半分子）と別の抗体の重-軽鎖対（半分子）の置換および組換えが起こることができる条件を意味する。典型的には、Fabアーム置換は、還元性環境の存在下で起こる。当業者であれば、前記還元性環境が、インビボで血流中に、したがって、また、ドナーから得られた血液および血清サンプル中で、自然に存在することを知っているであろう。しかしながら、還元性環境は、以下で定義され、本文を通じて

50

開示されるように、還元剤を添加することによって、インビトロ状況で、再作成されることができる。

【0051】

逆に、本明細書中で使用される場合、「Fabアーム置換が起こることができないような条件」は、1つの抗体の重-軽鎖対(半分子)と別の抗体の重-軽鎖対(半分子)の置換および組換えが起こることができない条件を意味する。当業者が知っているように、これは、一般的に、分子が反応することができないようにサンプルを凍結することによって、または抗体上に存在する遊離チオールを不活性化することによって、達成される。遊離チオールの不活性化は、典型的に、上記で定義され、本文を通じて開示されるようなアルキル化剤を用いて抗体をインキュベートすることによって達成される。

10

【0052】

「Fabアーム置換を防止する」は、前記置換が実質的に減少され、好ましくは、90%減少され、95%減少され、またはより好ましくは、99%減少される作成条件を意味する。典型的には、これは、サンプルを凍結することによって、反応性チオール基を不活性化することによって、または両方を組み合わせることによって、達成される。当業者は、例えば、非還元条件の使用によってなど、前記Fabアーム置換を防止する代替手段を理解するだろう。

【0053】

本明細書中で使用される場合、用語「アルキル化剤」は、アルキル基による水素の置換を引き起こす物質を意味する。本発明の意味の範囲内で、アルキル化剤の例としては、N-エチルマレイミド(NEM)、ヨードアセトアミド、およびヨード酢酸が挙げられるがこれらに限定されず、他のアルキル化剤としてはまた、アクリルアミド、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジンが挙げられる。

20

【0054】

本明細書中で使用される場合、所定の抗原への抗体の結合の文脈において、用語「結合」、「特異的に結合」、「特異的に結合される」は、例えば、検体として抗体を使用してBIAcore 3000装置で表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって決定される場合、約 $10^{-7}$  M以下、約 $10^{-8}$  M以下など、 $10^{-9}$  M以下など、約 $10^{-10}$  M以下、または約 $10^{-11}$  Mもしくはさらにそれ以下の $K_D$ に相当する親和性を有する結合を意味する。この用語はまた、抗体が、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば;ウシ血清アルブミン、カゼイン)に結合するその親和性よりも、少なくとも10倍より低い、例えば少なくとも100倍より低い、例えば、少なくとも1000倍より低い、例えば少なくとも10,000倍より低い、例えば、少なくとも100,000倍より低い $K_D$ に相当する親和性で所定の抗原に結合することを意味する。親和性がより低い量は、抗体の $K_D$ に依存するので、抗体の $K_D$ が非常に低い場合(すなわち、抗体が非常に特異的である場合)、その場合、抗原に対する親和性が、非特異的抗原に対する親和性より低い量は、少なくとも10,000倍であってもよい。

30

【0055】

本明細書中で使用される場合、用語「 $K_D$ 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を意味する。

40

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「抗原」は、上記で定義される意味において、特定の抗体分子に特異的に結合することができる分子を意味する。

【0057】

本明細書中で使用される場合、用語「マーカー」または「検出可能なマーカー」は、特異的に検出されることができる構造を意味する。マーカーは、典型的に、目的のタンパク質または他の分子に化学的に結合される、または結合されることができる分子である。当業者に公知のように、本発明の方法で使用され得る多くの異なるマーカーがある。マーカーの非限定的な例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)またはグルコースオキシダーゼなどの酵素が挙げられる。これらの酵素は

50

、特定の試薬の存在下で、観察可能な色の変化を生成するので、これらの酵素は、多くの場合、検出を可能にする。いくつかの場合、これらの酵素は、それらに光を発生させる試薬に暴露される。それは、電子的に励起された状態から基底状態に戻る場合、発光は、物質からの発光として記載される。発光の様々な形態（生物発光、化学発光、フォトルミネセンス）は、励起状態に到達する経路が異なる。例えば、フォトルミネセンスは、単に蛍光であり；励起は、特定の波長の光によって開始される。生物発光は、ルシフェリンおよび蛍ルシフェラーゼのような生物発光化合物の使用によって特徴付けられる。化学発光は、化学反応によって生成される光である一方、電気化学発光は、電流に応答して生成される。電気化学発光マーカーの非限定的な例としては、ルテニウムおよびオスミウムポリピリジン錯体系が挙げられる。マーカーのさらなる例としては、放出される放射能が、従来の方法を使用して、容易に検出されることができ放射能同位体が挙げられる。DNAレポーターはまた、マーカー、およびまた、フィコエリトリンなどの、しかしそれらに限定されない蛍光レポーターとして使用され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0058】

本明細書中で使用される場合、用語「マトリクス」は、結合分子が結合できる物理的担体を意味する。当業者であれば、本発明の範囲内でわかるように、マトリクスのさまざまな形態が、例えば、固体マトリクスのように、選択されうる。当該分野で一般的に使用される固体マトリクスとしては、ビーズ（例えば、アガロース、セファロース、ラテックス、磁性ナノ粒子）、マルチウェルプレート（例えば、ポリスチレン、ガラス）、膜（例えば、ニトロセルース、PVDf）が挙げられる。

#### 【0059】

本明細書中で使用される場合、用語「還元剤（reducing agent、reductantまたはreducer）」は、酸化還元化学反応において、別の化学種に電子を失う（または供与する）元素または化合物を意味する。還元剤は、電子を失っているので、酸化されているといえる。本発明の意味の範囲内で、当業者が理解するように、還元剤はチオール（-SH）基を生成することによって、ジスルフィド基が反応性になることを可能にする。還元剤の非限定的な例としては、グルタチオン、メルカプトエタノール（ $\beta$ -ME）、ジチオスレイトール（DTT）またはトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）が挙げられる。

#### 【0060】

本明細書中で使用される場合、用語「反応性チオール基を不活性化する」は、不要なチオール-ジスルフィド置換反応を防止するため、目的のタンパク質または他の分子に存在する全ての遊離チオール基をブロックすることを意味する。これは、典型的に、アルキル化剤を使用して、達成される。

#### 【実施例】

#### 【0061】

##### 材料および方法

##### 抗体および試薬

ヒト化抗IL-6野生型IgG4抗体、そのS228P点突然変異体抗IL-6 S228P IgG抗体、ヒト化抗TNF野生型IgG4抗体およびヒト化抗CD22 IgG1野生型抗体は、Petersら、2012年で記載されるように、発現され、精製された。IgG4の野生型定常領域について配列番号1、および突然変異定常領域について配列番号2を参照（元の参照が全長抗体配列に基づいていると仮定して、この配列において、セリンからプロリンへの突然変異は108位に現われる）。さらに、配列番号3は、IgG4軽鎖の定常領域に相当する一方、配列番号4および5は、それぞれ、IgG1定常領域の重および軽鎖に相当する。

#### 【0062】

組換えIL-6、TNF（Peprotech）および抗ヒト - 軽鎖特異的抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories）は、製造業者のプロトコルに従って、それぞれ、スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン（Thermo

Scientific)またはルテニウム-NHS-エステル(Meso Scale Discovery)を使用してビオチン化されたか、またはスルホタグ(Sulfo-tag)(登録商標)で標識された。

【0063】

患者サンプル-インビボFabアーム置換。

静脈内注射によってS228P抗IL-6抗体の単回3mg/kg用量を受けた健康なボランティアからの非特定化血漿サンプルは、第1相、無作為、二重盲検、プラセボ対照試験から得られた。

【0064】

Fabアーム置換

抗IL-6野生型IgG4または抗IL-6 S228P IgG4抗体およびそれらの潜在的な置換パートナー、すなわち、抗TNF野生型IgG4または抗CD22野生型IgG1抗体のいずれかは、次のように混合された。

【0065】

インビトロ試験について：pH7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)中で100µg/mlの総濃度で1:1のモル比で。

【0066】

ex vivo試験について：IgG4枯渇血漿またはIgG4枯渇血液のいずれかの中で、600µg/mlの総濃度で1:9のモル比で(結果参照)。

【0067】

ジスルフィド結合の還元を可能にするために、サンプルを、0.5mMの最終濃度に還元型グルタチオン(GHS)(Sigma)を用いて補足した。実験の開始時(t=0時間)に、混合物のアリコートは、10mMの最終濃度にN-エチルマレイミド(NEM)を受け(潜在的に、反応性チオール基を不活性化するため、したがって、Fabアーム置換を阻害する)、そして、37で16時間の間、反応の残りと一緒に、インキュベートした(t=16時間)。一晩のインキュベーション後、サンプル中のt=16時間のチオール基はまた、上記のように、不活性化された。

【0068】

非還元SDS-PAGE、クマシー染色およびウエスタンブロット法。

IgG4枯渇プロセスから得られた抗体およびサンプルは、(10mMの最終濃度に)NEMで補足された1×ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)のサンプル緩衝液において、3分間、100でインキュベートして、アーチファクトを最小化し、次に、4~20%勾配トリス-グリシンゲル(Invitrogen)を使用して分析した。SDS-PAGE後、ゲルは、ウエスタンブロット法のために、クマシーで染色されるか、またはニトロセルロース膜に移されるかのいずれかであった。膜は、適切なセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合一次抗体(ブロッキング緩衝液中でAbD Serotec 1:2,000)を用いたインキュベーション前に、攪拌しながら20で1時間、PBS/0.1%Tween-20(PBST、ブロッキング緩衝液)中5%ミルク(w/v)中で、ブロックされた。次に、膜をPBSTで洗浄し、化学発光基質を用いてインキュベートし、ImageQuant 4000 LASアナライザ(GE Healthcare)を使用して、撮像した。総タンパク質濃度は、280nmで吸光度を測定することによって、定量化された。

【0069】

IgG4枯渇および生理学的マトリクスの調製。

健康なヒトドナーからの全血を、ヘパリン含有バイアル(BD Bioscience)中に回収し、20で10分間、1,500gで遠心分離し、細胞から血漿を分離した。1.5mlの血漿を、続いて、20で、攪拌しながら1時間、2×250µlのキャプチャ選択IgG4(Capture Select IgG4)ビーズ(BAC オランダ)を用いてインキュベートした。インキュベーション後、未結合フロースルー材料(IgG4枯渇血漿)を回収し、4で保存した。ビーズを、100µlの1×SDSサンプル

10

20

30

40

50

ル緩衝液 (Invitrogen) での溶出前に、1 ml の生理食塩水 (mM で PSS : 145 NaCl、5.6 KCl、5.6 グルコース、1 MgCl<sub>2</sub>、1 CaCl<sub>2</sub>、15 HEPES ; pH 7.4) を用いて3回洗浄した。次に、得られた画分を非還元 SDS-PAGE により分析した (下記参照)。

【0070】

血漿から IgG 4 枯濁中、最初の全血の遠心分離からペレット化された血液細胞を、上記のように、PSS 中で再懸濁および遠心分離によって、3回洗浄した。次に、洗浄した血液細胞を、「IgG 枯濁血漿」(すなわち、キャプチャ選択 (Capture Select) IgG 4 ビーズからのフロースルー) 中で再懸濁し、「IgG 4 枯濁全血」を得た。

10

【0071】

インビトロでの Fab アーム置換 (FAE) の検出および定量化。

抗 TNF 野生型抗体との抗 IL-6 (野生型または S228P) 抗体のインビトロ Fab アーム置換が、定量化され、新たに形成された抗 IL-6 / 抗 TNF 二重特異性抗体 (二重特異性抗体) の存在は、本発明の方法を使用して、証明された。この場合、本発明の方法は、マトリクスとして、MSD (Meso Scale Discovery) マルチアレイプレートを使用して、実施された。これらのプレートは、各ウェルで、高容量炭素電極を含み、それは、セクターイメージャー (Sector Imager) 6000 アナライザー (Meso Scale Discovery) において、電気化学発光シグナルの測定を可能にする。

20

【0072】

第1に、FAE の間接的な定量化は、既存の、親の、二価の、単一特異性の抗 IL-6 抗体の、同じ抗原の2つの異なるタグ付けされた変異体を架橋する能力の「損失」によって決定された。(さらなる FAE を防止するために) NEM とのインキュベーション後の回収された反応サンプルは、PBS / 1% ウシ血清アルブミン (PB) 中で 1 : 4, 000 に希釈され、攪拌しながら 20 で 1 時間、ビオチン化 IL-6 およびスルホタグ (Sulfotag) 標識 IL-6 の 1 : 1 の混合物の 2 μg / ml でインキュベートされた。インキュベート後、サンプルを PB 前ブロックされたストレプトアビジン被覆 MSD プレートに移し、以下に記載されるように処理される前に 20 で 1 時間、その中で、攪拌しながらインキュベートされた。

30

【0073】

第2に、FAE は、新たに形成された抗 IL-6 / 抗 TNF 二重特異性抗体の2つの異なる抗原を架橋する能力の「獲得」によって決定されるように直接的にモニターされた。1 : 4, 000 の PB 希釈反応サンプルを、攪拌しながら、20 で 1 時間、PB 中でビオチン化 IL-6 およびスルホタグ (Sulfotag) (登録商標) 標識 TNF の 1 : 1 の混合物の 2 μ / ml でインキュベートされた。インキュベーション後、サンプルを PB 前ブロックされたストレプトアビジン被覆 MSD プレートに移し、20 で 1 時間、その中で、攪拌しながら、インキュベートした。

【0074】

タグが付された抗原とのインキュベーション後、ウェルを、Sector Imager 6000 アナライザー (Meso Scale Discovery) でシグナルが製造業者の読み込みバッファを使用して明らかにされ、測定される前に、PBST を用いて、3回、洗浄した。非ビオチン化 IL-6 が、ビオチン化変異体に対して置換される対照平行反応から得られえたバックグラウンド値は、全てのシグナルから減算された。少なくとも3つの独立した実験からの重複値は、全ての計算について使用された。平均標準誤差 (SEM) 値との平均データが、プロットされる。平均データは、MSD 値と一緒に加算し、反復測定値の数で割ることによって、計算された。平均標準誤差 (SEM) は、独立した実験の数の平方根で測定値の標準偏差を割ることによって計算された。

40

【0075】

インビボでの D228P 抗 IL-6 IgG 4 抗体 Fab アーム置換の検出。

50

S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 抗体を投与した健康なボランティアからの血漿サンプルは、規則的な時間間隔で採取され、2つの異なる M S D アッセイ、すなわち、総および無傷によって、分析された。総アッセイは、全ての一価抗体半分子（すなわち、非置換および置換種の両方）を検出する一方、無傷のアッセイは、単一特異的、二価抗体分子（すなわち、非置換種のみ）のみを検出する。

#### 【0076】

簡単にいえば、総アッセイのために、血漿サンプルは、P B 中で連続的に希釈され、ビオチン化 I L - 6 の  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  を用いて、20 で1時間、攪拌しながらインキュベートされた。インキュベーション後、サンプルを P B 前ブロックされたストレプトアビジン被覆 M S D プレートに移し、その中で、攪拌しながら、インキュベートした。次に、ウェルを、攪拌しながら、20 で別の1時間の間、P B 中で、（捕捉された S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 抗体 - 軽鎖半分子を標識するために）スルホタグ ( S u l f o - t a g ) (登録商標) 標識ヤギ抗ヒト - 軽鎖抗体の  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  とのインキュベーション前に、P B S T で3回洗浄し、以下の無傷アッセイ毎に処理した。

10

#### 【0077】

無傷のアッセイのために、P B で希釈後、血漿サンプルを、ビオチン化 I L - 6 およびスルホタグ ( S u l f o - t a g ) (登録商標) 標識 I L - 6 の 1 : 1 の混合物の  $2 \text{g}/\text{ml}$  を用いて、20 で1時間、攪拌しながらインキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、前に詳述したように、P B S T で洗浄し、シグナルを明らかにし、測定した。

20

#### 【0078】

連続希釈された S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 抗体の既知量が、検量線を得るための平行アッセイで使用され、それから血漿 S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 抗体濃度を算出した。2つの独立した実験からの重複値は、全ての計算について使用された。S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 抗体 F A E の量は、2つの生成されたプロファイルと比較することによって、評価された。インビボ血漿 S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 半減期は、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを使用して算出された。

#### 【0079】

### 結果

非還元 S D S - P A G E による抗体の分析

30

F A E を調査するために、4つの異なる抗体が使用された：抗 I L - 6 野生型 I g G 4、抗 I L - 6 S 2 2 8 P I g G 4、抗 T N F 野生型 I g G 4 および抗 C D 2 2 野生型 I g G 1。変性、非還元 S D S - P A G E およびクマシー染色による分析は、図 1 に示される。ゲルからわかるように、野生型 I g G 4 抗体は、2つの主要な種を含む不均一調製：フルサイズ、二価、単一特異的抗体（図 1 の白抜き矢印）および一価、単一特異性、重 - 軽鎖半分子に相当するより低い分子量種（図 1 の黒塗り矢印）である。A n g a l ら、1993 年で前に記載されるように、この I g G 4 野生型特異的不均一性は、E U 番号付けシステムに従って番号付けされた単一 S 2 2 8 P 点突然変異の導入によって、破壊される ( K a b a t ら、1991 年)。図 1、レーン 2 ( S 2 2 8 P I g G 4 ) よびレーン 4 ( 野生型 I g G 1 ) における重 - 軽鎖バンドの非存在に注意。

40

#### 【0080】

インビトロでの F a b アーム置換の調査。

インビトロで抗 I L - 6 I g G 4 F A E に対する S 2 2 8 P 突然変異の効果を研究するために、抗 I L - 6 野生型 I g G 4 または抗 I L - 6 S 2 2 8 P I g G 4 抗体は、1 : 1 のモル比で、抗 T N F 野生型 I g G 4 または抗 C D 2 2 野生型 I g G 1 抗体のいずれか一方と混合され、サンプルは、還元剤、グルタチオン ( G S H ) の存在下または非存在下で、37 でインキュベートされた。G H S の潜在的な有害な効果を制御するために、我々はまた、反応の並行セットにおいて、G H S の存在下、抗 I L - 6 野生型 I g G 4 または抗 I L - 6 S 2 2 8 P I g G 4 をそれだけでインキュベートした。インキュベーション後、サンプルを、本発明の方法によって F A E について分析した（図 2 A）。まず、

50

M S D ベースの方法を用いたが、これは親抗体の二価、単一特異性の性質を引き出し、同じ抗原の異なるタグ付けされた変異体との反応混合物のインキュベーションを含む。この方法による M S D シグナルの損失は、反応混合物からの親の I g G 4 単一特異性、二価抗体の損失、対応抗体との F A E による可能性（方法 1）を推察する。この方法による反応混合物の分析は、G H S を補充する抗 I L - 6 野生型 I g G 4 抗体および抗 T N F 野生型 I g G 4 抗体の両方を含むサンプルからのシグナルの有意な損失（約 28%）をもたらした（図 2 B）。興味深いことに、そのような損失は、G S H、抗 I L - 6 野生型 I g G 4 単独の非存在下、または野生型 I g G 1、またはサンプルを含む S 2 2 8 P I g G 4 のいずれかとのインキュベーション時には観察されなかった。

#### 【0081】

まとめると、これらの結果は、抗 I L - 6 野生型単一特異性、二価 I g G 4 抗体が、野生型抗 T N F I g G 4（野生型 I g G 1 でない）抗体との G H S 依存性 F A E により反応混合物から特異的な「損失」されることを暗示する。もし真実であれば、このプロセスは、抗 I L - 6 / 抗 T N F 二価特異性抗体の形成をもたらすはずである。

#### 【0082】

抗 I L - 6 / 抗 T N F 二重特異性抗体の存在を直接調査するために、全ての反応混合物の同等のアリコートは、第二の M S D ベースの方法を使用して、アッセイされた（図 2 A 参照）。この方法は、新たに形成された抗体の二価、二重特異性の性質を利用し、第 1 の捕捉に対する抗原の組み合わせとの反応混合物のインキュベーションを含み、次に、二重特異性抗体を明らかにする。この方法による M S D シグナルの獲得は、異種、単一特異性親抗体の F A E から新たに形成された二重特異性抗体の形成を推察する（方法 2）。この分析の結果、図 2 C は、方法 1 によるシグナルの損失を前に示した同じ反応におけるシグナルの関連する相補的な、特異的および重要な獲得を示す（すなわち、G S H 補足、抗 I L - 6 野生型 I g G 4 抗体および抗 T N F 野生型 I g G 4 抗体のサンプル）。シグナルのそのような獲得は、G H S、抗 I L - 6 野生型 I g G 4 単独、またはサンプルを含む S 2 2 8 P I g G 4 のいずれかの非存在下で検出されなかった。

#### 【0083】

まとめると、これらの結果は、これらの条件下、溶液からの野生型 I g G 4 の「損失」（図 2 B の方法 1 で観察されるような）は、抗 I L - 6 / 抗 T N F 二重特異性抗体の形成をもたらす野生型 I g G 4（野生型 I g G 1 ではない）抗体との G H S 依存性 F A E をもたらしめていることを証明する（図 2 C の方法 2 で観察される）。

#### 【0084】

内因性 I g G 4 抗体の枯渇した血漿および血液。

P B S は、F a b アーム置換をモニターする抗体フリーおよび緩衝環境を提供する一方、細胞および内因性因子の欠如は、このインビトロ緩衝が、生理学的に関連からほど遠いことを意味する。F A E をモニターする非常により適切な生理学的媒体は、血液または血漿であろう。しかしながら、これらの e x v i v o マトリクスの欠点は、未知の特異性の内因性 I g G 4 野生型抗体の存在と存在量であり、これは、F A E をもたらずそれらの固有の能力により、目的の我々の二重特異性抗体の形成の希釈をもたらすだろう（すなわち、抗 I L - 6 / 抗 T N F）。これは、最終的に、F A E の過少評価につながる。したがって、生理学的に関連する条件下で、目的の抗体のインビトロ F A E を正確にモニターするために、新規の、I g G 4 フリー緩衝培地は、図 3 A の抗 I g G 4 ビーズ（C a p t u r e S e l e c t I g G 4, B A C オランダ）を使用して、内因性 I G 4 抗体の枯渇した血液によって確立された。血液を遠心分離した後、上部血漿層は、採取され、徹底的な I g G 4 枯渇を確実にするため、抗 I g G 4 ビーズの 2 つのラウンドに付された。親和性マトリクスに対する I g G 4 抗体の非特異的吸収を制御するため、対照ビーズが並行して使用された。得られたサンプルは、H R P 結合抗 I g G 4 抗体を使用して非還元 S D S - P A G E およびウエスタンブロットによって分析された（図 3 B、左上パネル）。I g G 4 抗体のみが、このプロセス中に単離されていたことを検証し、確認するために、サンプルは、抗 I g G 1、2 および 3 H R P 結合抗体を使用して、S D S - P A G E およびウエス

10

20

30

40

50

タンブロットによってさらに分析された(図3B左下パネル)。IgG4抗体を含む画分は、プールされ、純度(>99%)は、SDS-PAGEおよびクマシー染色によって評価された(図3B、右)。280nmで吸光度を測定することによって、プールされた抗IgG4溶出液の総タンパク質含量は、600 $\mu$ g/mlであることが決定された。抗IgG4ビーズとのインキュベーション後に回収された非結合材料は、「IgG4枯渴血漿」を与え、洗浄血細胞の添加後に回収されたものは「IgG4枯渴全血」を与えた(図3A)。これらの2つの生理学的に関連する、バッファリングされた、IgG4フリーのマトリクスは、続いて、FAEをモニターするために使用された。

#### 【0085】

IgG4枯渴生理学的マトリクスにおけるインビトロS228P抗IL-6 IgG4 Fabアーム置換。

生理学的に関連する抗体濃度が、実験的に、FAEを研究するために使用されたことを証明するため、抗IgG4ビーズを使用して全血漿から除去された600 $\mu$ g/mlの内因性IgG4抗体(上記参照)は、事前混合抗IL-6(野生型またはS228Pのいずれか一方)IgG4抗体および抗TNF野生型IgG4抗体の等量で置換された。抗体の臨床的に関連する量で使用されたことを証明するため、60 $\mu$ g/mlの抗IL-6 IgG4抗体(3mg/kg静脈内投与の $C_{max}$ にほぼ等しい、J. Jose私信)は、540 $\mu$ g/ml(すなわち、9倍モル過剰)の抗TNF野生型IgG4抗体と混合された。抗体は、前述のMSDベースの方法によるFAEの分析前の16時間の間、37 $^{\circ}$ Cで、GSHの非存在下または存在下、2つのIgG4枯渴マトリクスのいずれかでインキュベートされた。

#### 【0086】

本発明の方法による反応混合物の分析は、37 $^{\circ}$ CでのGSH依存性インキュベーション中、抗TNF野生型IgG4抗体とインキュベートされた野生型(S228Pでない)抗IL-6 IgG4抗体のMSDシグナル(IgG4枯渴血で約66%およびIgG4枯渴血漿で約63%)の有意な損失を証明した(図4A、方法1)。

#### 【0087】

抗原としてIL-6およびTNFの組み合わせとのインキュベーションを使用するさらなるMSDベースの方法によって、これらの同じサンプルのさらなる分析は、シグナルの損失を以前に証明した同じ反応でのMSDシグナルの特異的および有意な獲得を示した(図4B)。まとめると、これらの結果は、S228P IgG4でない抗IL-6野生型抗体は、これらの生体外条件の下、GSHの存在下、抗TNF野生型IgG4抗体とのFAEを受けることを示唆する。

#### 【0088】

興味深いことに、補充GSHの非存在下でさえ、野生型抗体変異体(S228P変異体でない)はまた、IgG4枯渴全血(IgG4枯渴血漿でない)におけるFAEの有意なおよび検出可能なレベルに参与する(図4)。これらの2つのマトリクス間の唯一の違いは血液細胞の存在にあるので、これらのデータが示唆することは、FAE反応を触媒しているのが、これらまたはこれらの成分であるということである。

#### 【0089】

インビボS228P抗IL-6 IgG4 Fabアーム置換。

現在までに、生理学的および臨床的に関連するインビボ条件を再現することによって、インビトロFAEに参加するS228P抗IL-6 IgG4の傾向が、調査されている。しかしながら、(材料および方法で説明するように)インビボS228P抗IL-6 IgG4 FAEを直接調査するために、血漿サンプルは、2つのMSDアッセイによって、S228P抗IL-6 IgG4臨床試験の非特定のヒトボランティアから採取された血漿サンプルを、アッセイした。最初のMSDアッセイ(合計)は、IL-6抗原に結合できる置換および非置換一価S228P抗IL-6 IgG4半分子の両方を測定するために設計され、一方、第2のアッセイ(無傷)は、非交換、単一特異性、二価S228P抗IL-6 IgG4分子のみを測定するために設計された。これらの2つの方法から

10

20

30

40

50

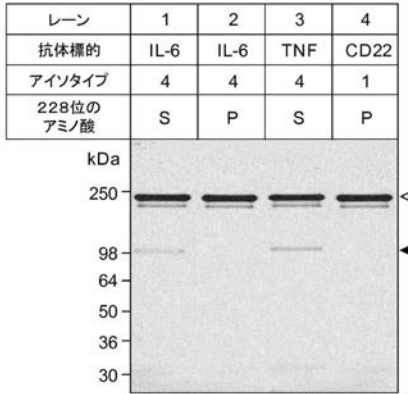
の血漿濃度プロファイルの比較は、インビボ S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 F A E の程度を示すだろう。しかしながら、図 5 からわかるように、2つの方法による S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 の分析は、試験された臨床対象の両方に対する S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 血漿濃度プロファイルの重複を生じた。これは、S 2 2 8 P 抗 I L - 6 I g G 4 は、インビボ F a b アーム置換で、任意の有意なレベルでは参加しないことを推測させる。

【 0 0 9 0 】

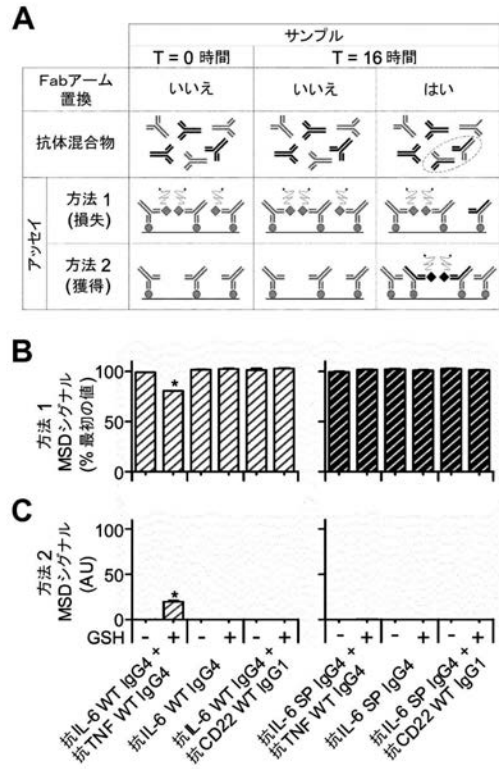
#### 引用文献

- Aalberse, R.C., et al., Immunoglobulin G4: an odd antibody (イムノグロブリン G 4 : 奇妙な抗体). Clin Exp Allergy, 2009. 39(4): p. 469-77. 10
- Angal, S., et al., A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. (単一アミノ酸置換は、キメラマウス/ヒト ( I g G 4 ) 抗体の異種性を無効にする) Mol Immunol, 1993. 30(1): p. 105-8.
- C. Jacob, et al. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. (硫黄およびセレン: タンパク質構造および機能における酸化状態の役割) Chem., Int. Ed., 2003, 42, 4742-4758).
- Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. (免疫学的目的のタンパク質の配列) Fifth edition ed1991.
- Peters, S.J., et al., Engineering an improved IgG4 molecule with reduced disulfide bond heterogeneity and increased Fab domain thermal stability. (ジスルフィド結合の異種性が低減し、Fabドメイン熱安定性が増大した改良 I g G 4 分子のエンジニアリング) J Biol Chem, 2012. 287(29): p. 24525-33. 20
- Shapiro, R.I., et al., Development and validation of immunoassays to quantify the half-antibody exchange of an IgG4 antibody, natalizumab (Tysabri(R)) with endogenous IgG4. ( I g G 4 抗体、内因性 I g G 4 を有するナタリズマブ ( T y s a b r i (登録商標) ) の半抗体置換を定量化するための免疫アッセイの開発および検証) J Pharm Biomed Anal, 2011. 55(1): p. 168-75.
- van der Neut Kolfschoten, M., et al., Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. (動的な F a b アーム置換によるヒト I g G 4 抗体の抗炎症活性) Science, 2007. 317(5844): p. 1554-7. 30

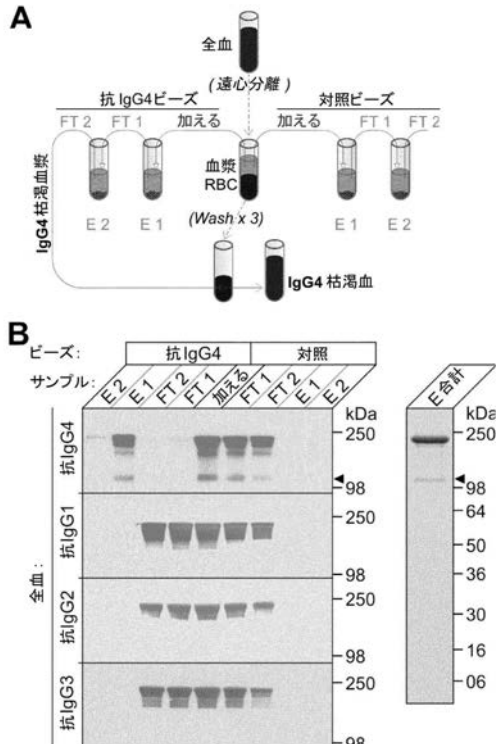
【 図 1 】



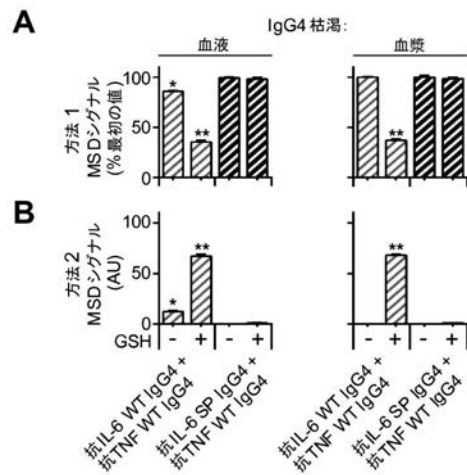
【 図 2 】



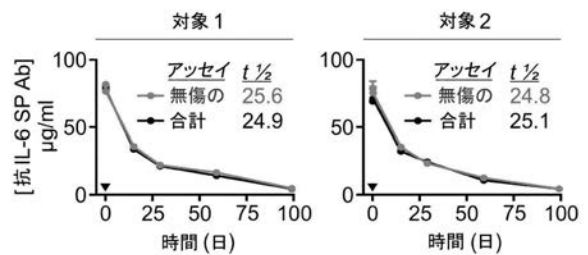
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2017516103000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/060179
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 A61K47/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/124450 A1 (UCB PHARMA SA [BE]) 29 August 2013 (2013-08-29) (p 54, para 3 ff)	1-15
A	----- RENÉE I. SHAPIRO ET AL: "Development and validation of immunoassays to quantify the half-antibody exchange of an IgG4 antibody, natalizumab (Tysabri) with endogenous IgG4", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, vol. 55, no. 1, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 168-175, XP055153188, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2011.01.006 (p 175, col 1, para 2; Fig 1)(p 170, col 2, para 2) ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  11 June 2015		Date of mailing of the international search report  22/06/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bigot-Maucher, Cora

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/060179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DONG JIANYING ET AL: "A stable IgG-like bispecific antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 3, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 273-288, XP009157605, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/MABS.3.3.15188 (p 278, col 1, last para); abstract	1-15
A	----- REINARTZ H W ET AL: "Bispecific multivalent antibody studied by real-time interaction analysis for the development of an antigen-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay", THE ANALYST, R S C PUBLICATIONS, GB, vol. 121, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 767-771, XP009157607, ISSN: 0003-2654 abstract	1-15
A	----- KOLFSCHOTEN MARIJN VAN DER NEUT ET AL: "Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 317, no. 5844, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1554-1557, XP009104480, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1144603 abstract; figure 1	1-15
A	----- US 2009/162360 A1 (KLEIN CHRISTIAN [DE] ET AL) 25 June 2009 (2009-06-25) example 3B -----	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/060179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2013124450	A1	29-08-2013	AU 2013224003 A1	18-09-2014
			CA 2864439 A1	29-08-2013
			CN 104321341 A	28-01-2015
			EA 201491569 A1	30-01-2015
			EP 2817332 A1	31-12-2014
			JP 2015513537 A	14-05-2015
			KR 20140127890 A	04-11-2014
			US 2015018529 A1	15-01-2015
			WO 2013124450 A1	29-08-2013
			-----	
US 2009162360	A1	25-06-2009	AR 069775 A1	17-02-2010
			AU 2008340694 A1	02-07-2009
			CA 2709430 A1	02-07-2009
			CN 101903406 A	01-12-2010
			CO 6280543 A2	20-05-2011
			CR 11465 A	16-08-2010
			DK 2225280 T3	26-05-2014
			EC SP10010297 A	30-07-2010
			EP 2225280 A1	08-09-2010
			ES 2471266 T3	25-06-2014
			HK 1145845 A1	12-07-2013
			HR P20140727 T1	29-08-2014
			IL 206108 A	31-07-2013
			JP 5281098 B2	04-09-2013
			JP 2011505848 A	03-03-2011
			KR 20100087394 A	04-08-2010
			KR 20130016397 A	14-02-2013
			MA 31925 B1	01-12-2010
			NZ 585774 A	28-10-2011
			PE 11692009 A1	03-08-2009
			PT 2225280 E	09-07-2014
			RU 2010129540 A	27-01-2012
			SI 2225280 T1	31-07-2014
			TW 200932271 A	01-08-2009
			UA 100874 C2	11-02-2013
			US 2009162360 A1	25-06-2009
			WO 2009080253 A1	02-07-2009
-----				

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ホセ、ジョディー

イギリス国、パークシャー、スラウ、パスロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディー

(72)発明者 カービー、ヒシャニ

イギリス国、パークシャー、スラウ、パスロード 208、ユセベ セルテック、アイピーディー

專利名稱(译)	确定抗体特异性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017516103A</a>	公开(公告)日	2017-06-15
申请号	JP2016567597	申请日	2015-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	UCB制药生物藻厄尔萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	UCB制药生物藻厄尔萨尔瓦多		
[标]发明人	シルヴァジョン ヴェテルレインオリヴィア ホセジョディー カービーヒシャニ		
发明人	シルヴァ、ジョン ヴェテルレイン、オリヴィア ホセ、ジョディー カービー、ヒシャニ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N		
优先权	2014168317 2014-05-14 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种确定抗体特异性的方法，所述方法是：多价抗体是单特异性的，特别是二价抗体是单特异性还是双特异性的。此外，本发明提供了定量样品中存在的双特异性二价抗体的量的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-516103 (P2017-516103A) (43) 公表日 平成29年6月15日 (2017.6.15)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)	FI G01N 33/53 ZNA.N	テーマコード (参考)
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-567597 (P2016-567597)	(71) 出願人 514232085 ユージービー バイオファルマ エスピー アルエル ベルギー国 1070 ブリュッセル ア レ デラ レシエルシエ 60	
(86) (22) 出願日 平成27年5月8日 (2015.5.8)	(72) 発明者 シルヴァ、ジョン イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、 アイビーディー	
(85) 翻訳文提出日 平成29年1月11日 (2017.1.11)	(72) 発明者 ヴェテルレイン、オリヴィア イギリス国、パークシャー、スラウ、パス ロード 208、ユセベ セルテック、 アイビーディー	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/060179		
(87) 国際公開番号 W02015/173135		
(87) 国際公開日 平成27年11月19日 (2015.11.19)		
(31) 優先権主張番号 14168317.7		
(32) 優先日 平成26年5月14日 (2014.5.14)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗体特異性を決定するための方法		