

(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2016-531546

(P2016-531546A)

(43) 公表日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/37 (2006.01)
G 01 N 33/68 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/37
G 01 N 33/68

Z N A

テーマコード(参考)

2 G 04 5
4 B 06 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2016-515415 (P2016-515415)
 (86) (22) 出願日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年5月16日 (2016.5.16)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/069920
 (87) 國際公開番号 WO2015/040125
 (87) 國際公開日 平成27年3月26日 (2015.3.26)
 (31) 優先権主張番号 1316744.0
 (32) 優先日 平成25年9月20日 (2013.9.20)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

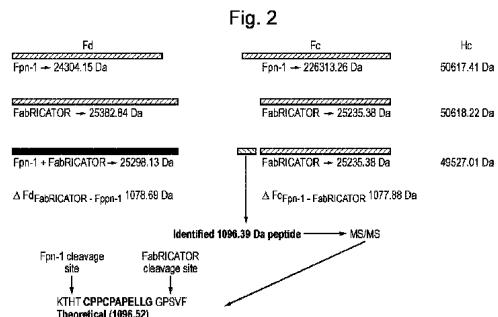
(71) 出願人 510069917
 ジエノビス エービー
 スウェーデン国 エスイー-220 07
 ランド, ピー. オー. ボックス 790
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 オルソン, フレデリック
 スウェーデン国 244 32 カプリン
 ジ オストラ ラングガタン 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫グロブリン分子試料を分析する方法

(57) 【要約】

本発明は、免疫グロブリン試料を分析する方法、関連ペプチド、およびそのような方法を実施するためのキットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン分子試料を分析する方法であって、前記試料を第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドと接触させるステップ、ならびに生じた混合物を分析するステップを含み、前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが、ヒトIgGのヒンジ領域において異なる標的部位をそれぞれ切断するシステインプロテアーゼ酵素である、方法。

【請求項 2】

前記第1のポリペプチドが、IgGの前記ヒンジ領域をKabatナンバリングシステムによる238および239位(EUナンバリングシステムによる225および226位)の間で切断する、および/または前記第2のポリペプチドが、IgGの前記ヒンジ領域をKabatナンバリングシステムによる249および250位(EUナンバリングシステムによる236および237位)の間で切断する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第1のポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列、またはその変異体もしくはフラグメントを含むまたはからなり、前記第2のポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列、またはその変異体もしくはフラグメントを含むまたはからなる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記配列の変異体が、前記配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列であり、前記配列のフラグメントが、前記配列の最大300個の連続するアミノ酸を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料中の少なくとも1つの免疫グロブリン分子がIgG分子、好ましくはヒトIgG分子である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも1つの前記IgG分子が、治療薬と、好ましくは前記IgG分子のシステイン残基のチオール基を介して結合する、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記システイン残基が、前記IgG分子の前記ヒンジ領域にある、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記治療薬が細胞毒、好ましくはアウリスタチン、カリケアミシン、CC-1065、ドキソルビシン、メイタンシノイド、メトトレキサート、およびビンカアルカロイドから選択される、請求項6または7に記載の方法。

【請求項 9】

(a) 前記試料を前記第1のポリペプチドと接触させるステップ、
 (b) 生じた混合物からFcフラグメントを単離するステップ、
 (c) 前記単離されたFcフラグメントを前記第2のポリペプチドと接触させるステップ、および
 (d) 生じた混合物を分析するステップ

を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 前記試料を前記第2のポリペプチドと接触させるステップ、
 (b) 生じた混合物からFabフラグメントを単離するステップ、
 (c) 前記単離されたFabフラグメントを前記第1のポリペプチドと接触させるステップ、および
 (d) 生じた混合物を分析するステップ

を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

(a) 前記試料を前記第1および前記第2のポリペプチドの両方と接触させるステップ、ならびに

(b) 生じた混合物を分析するステップ
を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記生じた混合物を分析するステップが、前記混合物中の少なくとも1つの分子の分子量を、好ましくは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)および/または質量分析を使用して決定するステップを含む、請求項8から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記分析が、約1096Daの分子量を有するペプチドの有無および/または量を決定するステップを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記ペプチドが、配列C P P C P A P E L L G (配列番号3)、または1つもしくは2つの保存された変更を含み、好ましくは前記変更が前記配列の2~10位内でのみ起こる前記配列の変異体からなる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記分析が、
(a) 治療薬が結合しているおよび/または結合していない、前記試料中の免疫グロブリン分子の割合、
(b) 治療薬：免疫グロブリン分子の比、および/または
(c) 配列番号3に示すアミノ酸配列の翻訳後修飾の有無
を決定するために実施される、請求項11から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

アミノ酸配列C P P C P A P E L L G (配列番号3)、または1つもしくは2つの保存された変更を含み、好ましくは前記変更が前記配列の2~10位内でのみ起こる前記配列の変異体からなるペプチドであって、場合によって前記ペプチドが治療薬に結合する、ペプチド。

【請求項17】

免疫グロブリンを含む試料を、請求項1で定義される第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドと接触させることにより生産される、請求項16に記載のペプチド。

【請求項18】

免疫グロブリン分子試料を分析する方法において使用するためのキットであって、請求項1で定義される第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫グロブリン試料を分析する方法、関連ペプチド、およびそのような方法を実施するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

構造特性評価および生理化学分析などで抗体を特性評価することが、抗体ベースの治療法の開発者および製造者に必要とされている。質量分析(MS)は、治療用モノクローナル抗体(MAb)を特性評価するための重要な分析手段の1つである。HPLCと組み合わせた質量分析は、これらの大きな生体分子の一次構造、ならびに翻訳後修飾(PTM)およびグリカン構造を研究するために一般に使用される。大きなサイズのMAb(150kDa)に翻訳後修飾(PTM)が伴うことによって、これらの生物学的治療法を分析的に特性評価することが特に困難となっている。

【0003】

例えば、抗体薬物複合体(ADC)は、治療薬の標的化された送達を実現するためにモノクローナル抗体(mAb)の選択性を利用する、治療薬の重要なクラスである。抗体の

10

20

30

40

50

標的部位特異性および結合特性、リンカーおよび治療薬のインビトロおよびインビボでの安定性、治療薬の有効性、ならびに抗体における治療薬の分布および平均数の両方が、ADCの臨床有効性に極めて重要である。したがって、ADCの生理化学的特性を理解し、製造およびその後の保存中にADCを評価およびモニターするための分析および生物学的分析技術を開発することが重要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

ストレプトコッカルエリスロジェニックトキシンB(SpeB)は、化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来のシステインプロテアーゼであり、IgGをヒンジ領域において、2つの安定な単量体Fabフラグメントおよび1つのFcフラグメントに切断することが示されている。具体的には、SpeBはヒトIgGをグリシン残基236および237の間で切断することが報告されている。化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来の第2のシステインプロテアーゼである、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)の免疫グロブリンG分解酵素(IdeS)は、IgGに対してSpeBと同一の切断部位を有すると報告されている。

10

【0005】

本発明者らは、IgGに対するSpeBおよびIdeSの活性を慎重に検証し、SpeBが実際には、ヒンジ領域においてIdeSとは異なる部位でIgGを切断するという驚くべき発見を成した。本発明者らは、この驚くべき発見を発展させ、SpeBおよびIdeSによる免疫グロブリンのタンデム切断により、以前に考えられていたよりも詳細に、免疫グロブリン分子のヒンジ領域を研究することが可能になることに気が付いた。このことは、ヒンジ領域が、翻訳後修飾および抗体薬物複合体における治療薬の結合に重要な部位であるため、重要である。したがって、本発明は以下を提供する。

20

【0006】

免疫グロブリン分子試料を分析する方法であって、試料を第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドと接触させるステップ、ならびに生じた混合物を分析するステップを含み、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、ヒトIgGのヒンジ領域において異なる標的部位をそれぞれ切断するシステインプロテアーゼ酵素である、方法。

30

【0007】

アミノ酸配列C P P C P A P E L L G(配列番号3)、または1つもしくは2つの保存された改変を含む前記配列の変異体からなるペプチド。

【0008】

免疫グロブリン分子試料を分析する方法において使用するためのキットであって、上で定義される第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】IdeS(FabRICATOR)単独、SpeB(Fpn-1)およびIdeSの両方、またはSpeB単独によるヒトモノクローナルIgG1抗体ハーセプチンの切断後の、SDS-PAGEの結果を示す図である。

40

【図1B】IdeS(FabRICATOR)単独、SpeB(Fpn-1)およびIdeSの両方、またはSpeB単独によるヒトモノクローナルIgG1抗体ハーセプチンの切断後の、SDS-PAGEの結果を示す図である。

【図2】質量分析(LC/MS)により決定された、ヒトモノクローナルIgG1(ハーセプチン)に対するSpeB(Fpn-1)およびIdeSの異なる切断部位の図式的概要を示す図である。

【図3】FabおよびFcフラグメントを生じる、SpeB(Fpn-1)によるヒトIgG切断の図式的概要を示す図である。ヒンジ領域における新規のSpeB切断部位も示す。

【図4A】アバスチン、ハーセプチン、およびアドセトリス抗体由来のペプチドのヒンジ

50

領域を重ね合せた RP クロマトグラムを示す図である。

【図 4 B】アバスチン、ハーセプチン、およびアドセトリス抗体由来のペプチドのヒンジ領域を重ね合せた RP クロマトグラムを示す図である。図 4 B では、対照の合成ヒンジペプチドを加えている。 [配列の簡単な説明]

【0010】

配列番号 1 は、化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) Spe B のアミノ酸配列である。

配列番号 2 は、化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) AP 1 から単離された IdeS をコードするアミノ酸配列である。

配列番号 3 は、Spe B および IdeS による例示的 IgG 分子 (ハーセプチン) の切断により生じるペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号 4 は、例示的 IgG 分子 (ハーセプチン) のヒンジ領域の一部のアミノ酸配列である。(図 2 に示すように) この配列は Spe B (Fpn-1) および IdeS (FabRICATOR) の切断部位を含む。

配列番号 5 は、Met Ala N 末端を Spe B 配列に含む、化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) Spe B のアミノ酸配列である。

配列番号 6 は、推定シグナル配列を含む、化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) AP 1 から単離された IdeS をコードするアミノ酸配列である。

配列番号 7 は、Spe B および IdeS により認識されるヒンジ領域を含む、例示的 IgG 分子 (ハーセプチン) の抗 HER2 重鎖 1 のアミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

開示される方法および産物の様々な適用を、当技術分野における特定の必要性に合わせることが可能であることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は本発明の特定の実施形態を記載するためだけのものであり、限定的であることを意図されないことも理解されるべきである。さらに、この明細書および添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「a」「an」および「the」は、その内容が他に明確に指示されない限り、複数形の対象を含む。したがって、例えば「an immunoglobulin」への言及は 2 つ以上のそのような免疫グロブリンなどを含む。これ以前であれ以降であれ、本明細書で引用される全ての出版物、特許および特許出願は、その全体にわたって、参照により本明細書に組み込まれる。

【0012】

本発明は、免疫グロブリン分子試料を分析する方法であって、試料を第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドと接触させるステップを含む、方法を提供する。試料は典型的には少なくとも 1 つの IgG 分子を含み、方法は典型的にはエクスピボで、好ましくはインビトロで実施される。

【0013】

第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドは酵素であり、具体的には IgG、好ましくはヒト IgG を重鎖のヒンジ領域において切断するシテインプロテアーゼ酵素である。第 1 および第 2 のポリペプチドは、IgG の重鎖のヒンジ領域において異なる切断部位を標的とする。したがって、免疫グロブリン分子試料を第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドと接触させることで多様なサイズの分子の混合物が生じ、これを分析して元の試料についての情報を得ることができる。混合物は特に、第 1 のポリペプチドの切断部位と第 2 のポリペプチドの切断部位との間に、IgG の重鎖のヒンジ領域由来の短鎖ペプチドを含む。本発明の方法は、典型的にはこの短鎖ペプチドの有無、および / または量を決定する。本発明の方法はさらに、例えば翻訳後修飾および / または治療薬などの結合部分の有無を決定するために、短鎖ペプチドを分析することも可能である。

【0014】

第 1 のポリペプチドは、典型的には Spe B ポリペプチド、好ましくは化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) 由来の Spe B ポリペプチドである。第 1 のポリペプチドは、好ましくはパパインではない。第 1 のポリペプチドは、他の生物、例えば他のレンサ球菌属 (Stre

10

20

30

40

50

ptococcus) の細菌、例えばサーモフィラス菌 (Streptococcus thermophilus) 由来の S p e B ポリペプチドであってもよい。第 1 のポリペプチドは、好ましくは配列番号 1 または 5 に示すアミノ酸配列を含むまたはからなる。

【0015】

第 1 のポリペプチドは、I g G のヒンジ領域を K a b a t ナンバリングシステムによる 238 および 239 位 (E U ナンバリングシステムによる 225 および 226 位) の間で切断する。実施例の方法により、S p e B は配列番号 7 (ハーセプチンの抗 H E R 2 重鎖 1) のアミノ酸番号 229 および 230 の間を切断する。S p e B ポリペプチドは任意の好適な手段により得られる。例えば、それを発現する任意の好適な生物、例えば化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) 細菌などからそれを単離可能である。S p e B ポリペプチドは市販されている。

10

【0016】

第 2 のポリペプチドは、典型的には I d e S ポリペプチド、好ましくは化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) 由来の I d e S ポリペプチドである。第 2 のポリペプチドは、他の生物、例えば他のレンサ球菌属 (Streptococcus) の細菌由来の I d e S ポリペプチドであってもよい。レンサ球菌属 (Streptococcus) は、好ましくは群 A レンサ球菌属 (Streptococcus) 、群 C レンサ球菌属 (Streptococcus) 、または群 G レンサ球菌属 (Streptococcus) である。具体的には、第 2 のポリペプチドは群 C レンサ球菌属 (Streptococcus) 、例えば S · エクイ (S. equii) または S · ズーエピデミクス (S. zooepidemicus) 由来の I d e S ポリペプチドであってもよい。代わりに、第 2 のポリペプチドはシュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 由来であってもよい。第 2 のポリペプチドは、好ましくは配列番号 2 または 6 に示すアミノ酸配列を含むまたはからなる。

20

【0017】

第 2 のポリペプチドは、I g G のヒンジ領域を K a b a t ナンバリングシステムによる 249 および 250 位 (E U ナンバリングシステムによる 236 および 237 位) の間で切断する。実施例の方法により、I d e S は配列番号 7 (ハーセプチンの抗 H E R 2 重鎖 1) のアミノ酸番号 240 および 241 の間を切断する。I d e S ポリペプチドは任意の好適な手段により得られる。例えば、それを発現する任意の好適な生物、例えば化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) 細菌などからそれを単離可能である。I d e S ポリペプチドは市販されている。

30

【0018】

第 1 および第 2 のポリペプチドの異なる切断部位を説明するため、例示的 I g G 分子 (ハーセプチン) のヒンジ領域から取られた配列を以下に示す。第 1 のポリペプチドは、2 つの イタリック体 で下線を引いた残基の間を切断する。第 2 のポリペプチドは、2 つの 太字 で下線を引いた残基の間を切断する。

【化 1】

K T H T C P P C P A P E L L L G G P S V F (配列番号 4)

40

【0019】

この配列を含む I g G 分子を第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドで切断することによって、新規の短鎖ペプチドが生じる。前記ペプチドは K a b a t ナンバリングシステムによるヒンジ領域の 239 ~ 249 の残基 (E U ナンバリングによる 226 ~ 236 の残基) に対応する。前記ペプチドは、典型的には約 1096 D a (最も近い D a) の分子量を有し、典型的には配列 C P P C P A P E L L G (配列番号 3) からなっていてよい。前述から理解されるであろうが、短鎖ペプチドの分子量は、239 ~ 249 の残基 (K a b a t ナンバリング) のいずれか 1 つに結合した他の部分 (例えば治療薬など) の存在、またはそれらの残基のいずれか 1 つの翻訳後修飾 (例えばグリコシル化) により変化

50

するであろう。第1および第2のポリペプチドの切断部位を図2でさらに説明する。

【0020】

本発明の方法のために、第1のポリペプチドおよび/または第2のポリペプチドは、それらの各変異体またはフラグメントが元のポリペプチドの機能特性を維持しているという条件で、前記変異体またはフラグメントで置き換えることができる。具体的には、第1のポリペプチドの変異体またはフラグメントはIgGステインプロテアーゼ活性を維持し、第1のポリペプチドと同一部位でIgGを切断しなければならない。第2のポリペプチドの変異体またはフラグメントはIgGステインプロテアーゼ活性を維持し、第2のポリペプチドと同一部位でIgGを切断しなければならない。

【0021】

任意のポリペプチドのステインプロテアーゼ活性は、好適なアッセイを用いて決定可能である。例えば、試験ポリペプチドを好適な温度、例えば37でIgGとともにインキュベートすることが可能である。次いで出発物質および反応産物をSDS-PAGEにより分析し、望ましいIgG切断産物が存在するかどうかを決定することが可能である。切断産物にN-末端シーケンシングを行い、切断がIgGのヒンジ領域において起こったことを検証することが可能である。ポリペプチドのステインプロテアーゼ活性は、阻害研究によりさらに特性評価することが可能である。好ましくは、活性は、ともにプロテアーゼ阻害剤である、ペプチド誘導体Z-LVG-CHN₂および/またはヨード酢酸により阻害される。しかし、第2のポリペプチド(またはその変異体もしくはフラグメント)については、活性は一般的にE64により阻害されない。

10

20

【0022】

ポリペプチドの特定の切断部位の維持についても、任意の好適な手段により決定することが可能である。例えばそれを、ポリペプチドによるIgGの切断から生じるフラグメントを、切断部位があらかじめ確認されているポリペプチドによるIgGの切断から生じるフラグメントと比較することにより決定することが可能である。例えば、第1のポリペプチドの変異体またはフラグメントは、配列番号1または5のポリペプチドと同一のフラグメントを生じなければならない。第2のポリペプチドの変異体またはフラグメントは、配列番号2または6のポリペプチドと同一のフラグメントを生じなければならない。

30

【0023】

第1のポリペプチドの変異体は、配列番号1または5に対して少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドを含んでいてよい。配列番号1または5の変異体の同一性を、配列番号1もしくは5に示す配列の少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300個以上の連続するアミノ酸の領域、またはより好ましくは配列番号1もしくは5の全長にかけて測定することが可能である。

【0024】

第2のポリペプチドの変異体は、配列番号2または6に対して少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドを含んでいてよい。配列番号2または6の変異体の同一性を、配列番号2もしくは6に示す配列の少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300個以上の連続するアミノ酸の領域、またはより好ましくは配列番号2もしくは6の全長にかけて測定することが可能である。

40

【0025】

アミノ酸の同一性は、任意の好適なアルゴリズムを使用して算出可能である。例えば、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、例えばAltschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10に記載されているように、同一性を算出するまたは配列を並べる(例えば(典型的にはそれらのデフォルト設定で)同等のまたは対応する配列を同定する)ために使用可能である。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通して公的に入手可能である。このアルゴリズムは

50

、データベース配列中の同一の長さの文字列とアラインメントさせた場合、いくつかの正の値の閾値スコア T と一致または満たす、検索配列中の長さ W の短い文字列を同定することにより、高スコア配列対 (HSP) をまず同定することを含む。 T は隣接文字列スコア閾値とも称される (Altschul et al、上記を参照)。これらの最初の隣接文字列ヒットは、HSP を含む文字列を探し出すための探査を開始するためのシーザーとして作用する。文字列ヒットは、累積アラインメントスコアが増加しうる限り、各配列に沿って両方向に伸長する。各方向への文字列ヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大到達値から量 X 減少した場合、1つもしくは複数の負のスコアの残基のアラインメントが蓄積することにより、累積スコアが 0 もしくはそれ未満となった場合、またはいずれかの配列の端に到達した場合に停止される。BLASTアルゴリズムパラメーター W 、 T および X は、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTプログラムは文字列長さ (W) 11、BLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919を参照のこと) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = 4$ 、および両ストランドの比較をデフォルトとして使用する。

10

【0026】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性について統計的分析を行う。例えば Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787を参照のこと。BLASTアルゴリズムによりもたらされる類似性の1つの基準が、2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然に起こる確率を示す最小合計確率 ($P(N)$) である。例えば、第1の配列を第2の配列と比較した際に、最小合計確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、配列は他の配列と類似していると考えられる。代わりに、UWGCパッケージは、(例えば、そのデフォルト設定で使用される)、同一性を算出するために使用可能なBESTFITプログラムを提供している (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395)。

20

【0027】

変異体は対立遺伝子変異体、およびタンパク質配列内の单一のアミノ酸またはアミノ酸群の置換、欠失または挿入を含みうる。変異体配列は、元の配列と比較した場合に少なくとも 1、2、5、10、20、30、50 以上の (アミノ酸の置換、欠失または挿入でありうる) 突然変異において異なっていてよい。例えば、1~50、2~30、3~20、または 5~10 のアミノ酸置換、欠失または挿入がなされてよい。置換変異体は、好ましくは1つまたは複数のアミノ酸を同一数のアミノ酸で置き換え、保存されたアミノ酸置換を作り出すことを含む。例えば、アミノ酸は類似の特性を有する代替のアミノ酸、例えば他の塩基性アミノ酸、他の酸性アミノ酸、他の中性アミノ酸、他の荷電アミノ酸、他の親水性アミノ酸、他の疎水性アミノ酸、他の極性アミノ酸、他の芳香族アミノ酸、または他の脂肪族アミノ酸などで置換することが可能である。好適な置換体を選択するために使用可能な、20個の主要アミノ酸の一部の特性は以下の通りである。

30

【0028】

【表1】

Ala	脂肪族、疎水性、中性	Met	疎水性、中性
Cys	極性、疎水性、中性	Asn	極性、親水性、中性
Asp	極性、親水性、荷電 (-)	Pro	疎水性、中性
Glu	極性、親水性、荷電 (-)	Gln	極性、親水性、中性
Phe	芳香族、疎水性、中性	Arg	極性、親水性、荷電 (+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	極性、親水性、中性
His	芳香族、極性、親水性、荷電 (+)	Thr	極性、親水性、中性
Ile	脂肪族、疎水性、中性	Val	脂肪族、疎水性、中性
Lys	極性、親水性、荷電 (+)	Trp	芳香族、疎水性、中性
Leu	脂肪族、疎水性、中性	Tyr	芳香族、極性、疎水性

10

【0029】

第1のポリペプチドのフラグメントは、典型的には配列番号1または5の100以下、150、200、250、300または350個の連続するアミノ酸からなる。第2のポリペプチドのフラグメントは、典型的には配列番号2または6の100以下、150、200、250、300または350個の連続するアミノ酸からなる。

20

【0030】

本明細書に記載される任意のポリペプチド、変異体またはフラグメントのアミノ酸配列は、天然に存在しないアミノ酸を含むように、および/または化合物の安定性を増大させるように改変されうる。ポリペプチドが合成手段によって生産される場合、このようなアミノ酸は生産中に導入されうる。ポリペプチドは合成または組換え生産後にも改質されうる。本明細書に記載されるポリペプチド、変異体またはフラグメントはD-アミノ酸を使用して生産されうる。このような場合、アミノ酸はCからNの向きに逆の配列に連結するであろう。これは、このようなポリペプチドを生産するための、当技術分野における慣行である。いくつかの側鎖修飾が当技術分野において知られており、ポリペプチド、変異体またはフラグメントの側鎖になされてよく、それらが、本明細書に記述されうる、任意のさらに求められる活性または特性を維持しやすくなる。ポリペプチド、変異体またはフラグメントが化学的に修飾、例えば翻訳後に修飾されうることも理解されるであろう。例えば、それらはグリコシル化、リン酸化されているか、または修飾されたアミノ酸残基を含みうる。

30

【0031】

本発明の方法において使用される、免疫グロブリンを含む試料は、少なくとも1つのIgG分子を含むという条件で、例えばIgM、IgA、IgD、および/またはIgWなどの免疫グロブリン分子を含みうる。前記IgGは任意の種、例えばヒト、サル、ウサギ、ヒツジ、またはマウス由来であってよいが、好ましくはヒト由来である。前記IgGはヒト化されていてもキメラでもよい。IgGはマウスIgG2aまたはIgG3であってよい。好ましくは、IgGはヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。

40

【0032】

免疫グロブリン分子を含む任意の好適な試料が、本発明の方法において使用可能である。試料は、典型的には流体である。例えば、試料は血液、血清または唾液試料であってよい。代わりに、試料は合成的に生産された免疫グロブリンのバッヂから取られてもよく、または患者に投与するために、医薬担体または賦形剤とともに製剤化されてもよい。このように、試料は任意の治療用モノクローナル抗体または抗体薬物複合体を含んでいてよい。例えば、試料はアバスチン、ハーセプチン、またはアドセトリスの分子を含んでいてよ

50

い。

【0033】

試料は、好ましくは治療薬に結合した少なくとも1つのヒトIgG分子を含む。好ましくは、ヒトIgG分子はシステイン残基のチオール基を介して治療薬に結合する。好ましくは、システイン残基はヒトIgG分子のヒンジ領域、最も好ましくは239および249の残基(Kabatナンパリングシステム)の間にある。好ましくは、治療薬は細胞毒である。好適な毒素はアウリストチン、カリケアミシン、CC-1065、ドキソルビシン、メイタンシノイド、メトトレキサート、およびピンカアルカロイドを含む。

【0034】

本発明の方法は、以下のステップを含みうる：

- (a) 試料を第1のポリペプチドと接触させるステップ、
- (b) 生じた混合物からFcフラグメントを単離するステップ、
- (c) 単離されたFcフラグメントを第2のポリペプチドと接触させるステップ、および
- (d) 生じた混合物を分析するステップ。

【0035】

ステップ(a)は、第1のポリペプチドによる、試料中の免疫グロブリン分子の切断を可能にする任意の条件下で行われうる。好適な条件は実施例に記載される。典型的には、任意の標準緩衝液がpH6.5~8.0で使用される。標準緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリス、炭酸水素アンモニウム、MES、HEPES、および酢酸ナトリウムを含む。典型的には、試料は少なくとも20分間、少なくとも30分間、少なくとも40分間、少なくとも50分間、好ましくは少なくとも60分間、第1のポリペプチドとともにインキュベートされる。インキュベーションは、好ましくは室温で、より好ましくは約20、25、30、35、40、または45で、最も好ましくは約37で行われる。典型的には、酵素：抗体比は約1:50(w:v)である。典型的には、還元剤、例えばヨードアセトアミド、DTT、またはTCEPが使用される。

【0036】

ステップ(b)におけるFcフラグメントの分離は、任意の好適な方法を使用して行われうる。例えば、Fcフラグメントは、アフィニティ分離、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltration、または透析により、生じた混合物から分離されうる。典型的には、混合物は好適なFc結合剤と接触されうる。ステップ(a)から生じた混合物はヒトIgG-Fc結合樹脂にアプライされてよく、樹脂に結合しないFcフラグメント以外の成分(例えば、Fabフラグメント、還元剤、およびSpeBなど)は溶出されうる。Fc結合剤、例えばヒトIgG-Fc結合樹脂などは市販されている。

【0037】

ステップ(c)は、第2のポリペプチドによるFcフラグメントの切断を可能にする任意の条件下で行われうる。好適な条件は実施例に記載される。典型的には、任意の標準緩衝液が上記のように使用される。典型的には、試料は少なくとも20分間、少なくとも30分間、少なくとも40分間、少なくとも50分間、好ましくは少なくとも60分間、IgD-ESポリペプチドとともにインキュベートされる。インキュベーションは、好ましくは室温で、より好ましくは約20、25、30、35、40、または45で、最も好ましくは約37で行われる。典型的には、酵素：抗体比は約1:50(w:v)である。典型的には、還元剤は使用されない。

【0038】

ステップ(c)は場合によって、任意の好適な方法に従って、例えばステップ(c)から生じた混合物をヒトIgG-Fc結合樹脂にアプライすることにより、Fcフラグメントを除去するステップをさらに含みうる。Fcフラグメントは維持され、他の分子(例えば、第2のポリペプチドおよび1096Daペプチドを含む)は溶出され、次いで単離されうる。

10

20

30

40

50

【0039】

方法は、代わりに以下のステップを含みうる：

- (a) 試料を第2のポリペプチドと接触させるステップ、
- (b) 生じた混合物からF_abフラグメントを単離するステップ、
- (c) 単離されたF_abフラグメントを第1のポリペプチドと接触させるステップ、および
- (d) 生じた混合物を分析するステップ。

【0040】

ステップ(a)は、第2のポリペプチドによる、試料中の免疫グロブリン分子の切断を可能にする任意の条件下で行われうる。好適な条件は上記の通りである。

10

【0041】

ステップ(b)におけるF_abフラグメントの分離は、任意の好適な方法を使用して行われうる。例えば、F_abフラグメントは、F_cフラグメントを分離するための上記方法を使用して、生じた混合物から分離されうる。典型的には、任意の好適なF_ab結合剤が使用されうる。

【0042】

ステップ(c)は、第1のポリペプチドによるF_abフラグメントの切断を可能にする任意の条件下で行われうる。好適な条件は、第1のポリペプチドによる免疫グロブリン全体の切断について上記の通りである。

20

【0043】

ステップ(c)は場合によって、任意の好適な方法に従って、例えばステップ(c)から生じた混合物を好適なF_ab結合剤にアプライすることにより、F_abフラグメントを除去するステップをさらに含みうる。F_abフラグメントは維持され、他の分子(例えば、第1のポリペプチドおよび1096Daペプチドを含む)は溶出され、次いで単離されうる。

【0044】

方法は、代わりに以下のステップを含みうる：

- (a) 試料を第1および第2のポリペプチドの両方と接触させるステップ、ならびに
- (b) 生じた混合物を分析するステップ。

【0045】

ステップ(a)は、第1および第2のポリペプチドによる、試料中の免疫グロブリンの切断を可能にする条件下で行われる。好適な条件は上記の通りである。

30

【0046】

上記の先行するステップに關係なく、生じた最終混合物を分析するステップにおいて任意の好適な方法が使用されうる。典型的には、生じた混合物を分析するステップは、少なくとも1つの分子の分子量を、好ましくはHPLCおよび/または質量分析を使用して決定するステップを含む。

【0047】

生じた混合物の分析は、

- (a) 治療薬が結合している試料中の免疫グロブリン分子の割合、および/または
- (b) 治療薬：免疫グロブリン分子の比、および/または
- (c) 翻訳後修飾の有無

40

を決定するために実施されうる。

【0048】

治療薬が結合している試料中の免疫グロブリン分子の割合、および/または治療薬：免疫グロブリン分子の比を決定することは、関心部位に輸送されうる治療薬の量を決定する一助となり、試料の安全性および有効性の両方に直接影響しうる。典型的な方法は、UV/VIS、UV/MALDI、および/またはUV/DAR分光法、ならびに疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)分析を含む。

50

【0049】

生じた混合物は、典型的には約 1096 Da の分子量を有するペプチドの有無および/または量について分析されうる。上で説明され、実施例で示されるように、本発明の方法によるヒト Ig G の切断によって、典型的にはこのようなペプチドが生じるであろう。

【0050】

特定の実施形態（「オフライン」特性評価と称する）において、混合物は HPLC のみを使用して分析される。この実施形態は、典型的には免疫グロブリンまたは抗体薬物複合体があらかじめ（例えば HPLC および質量分析の両方によって）完全に特性評価されている場合に使用される。これは、HPLC クロマトグラムにおける各ピークが既に分かつており、高度に精密かつ正確に定義されうるためである。このような場合、ピークが予測された位置に現れると、試料はあらかじめ特性評価された試料と一致すると考えられうる。そうでなければ、何が異なるのかを決定するために、試料のさらなる分析が必要となりうる。例えば、試料をさらに特性評価するために、質量分析が使用可能である。この実施形態は、同一の抗体が定常的に大量生産され、定期的に試料が品質管理目的で試験される場合に特に有用でありうる。

10

【0051】

翻訳後修飾、例えばピログルタミン酸形成、酸化、脱アミド、異性化、糖化、ジスルフィドシャッフリング、ペプチド結合切断、および架橋などの有無を決定するための典型的な方法は、キャピラリー電気泳動（CE）、キャピラリー液体クロマトグラフィー（CLC）、UV 吸光度、およびレーザー誘起蛍光法（LIF）を含む。

20

【0052】

本発明は、配列番号 3 の配列、または好ましくは配列の 2 ~ 10 位以内のみに 1 つもしくは 2 つの保存された変更を含む前記配列の変異体を有する、単離されたペプチドも提供する。ペプチドは、本発明の第 1 および第 2 のポリペプチドにより、免疫グロブリンを含む試料を処理することで生産されうる。本発明は、上で定義される、任意の治療薬に結合した前記ペプチドをさらに提供する。

【0053】

本発明は、本発明の第 1 および第 2 のポリペプチドを含むキットも提供する。前記キットは、本発明の方法において使用可能である。

30

【0054】

以下の実施例で本発明を説明する。

【実施例 1】

【0055】

ヒト Ig G に対する Spe B 活性は、SDS-PAGE および質量分析を使用して検証されてきた。Spe B の切断部位が予想に反して、以前に報告されたものとは異なることが判明している。

【0056】

ヒトモノクローナル Ig G（ハーセプチン）を、IgE、Spe B、または両方の酵素の組み合わせとともにインキュベートした。SDS-PAGE 分析（図 1）は、以前の報告に反して、切断部位が両方の酵素について同一ではないことを示している。IgE および Spe B 単独と比較した場合の、IgE および Spe B の組み合わせについての、SDS-PAGE で観察された質量シフトは、切断部位が異なることを示している。これは、（続いて反応に添加された）IgE が Spe B により生じたフラグメントを切断できることを示している。

40

【0057】

IgE および Spe B の切断部位をさらに研究するために、質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー（LC/MS）を、上記の SDS-PAGE の結果を検証するため、および切断部位の詳細を明らかにするために使用した。LC/MS 分析の結果は図 2 にまとめられており、Spe B および IgE についての異なる切断部位を裏付けている。Spe B の図式的概要を図 3 に示す。

【実施例 2】

50

【0058】

ヒンジ領域ペプチド C P P C P A P E L L G (配列番号 3 に示す) を、抗体試料から調製した。

【0059】

抗体試料 (アバスチン、ハーセプチン、およびアドセトリス) の Fc フラグメントを、まず His タグを付けた組換え Spe B 酵素 (Fpn-1 とも称する) を使用して単離した。この切断反応を、37 で 1 時間、酵素 : 抗体比 1 : 50 (w : w) および 1 ~ 5 mM の還元剤 DTT または TCEP を使用して、pH 6.5 ~ 8.0 の標準緩衝液中で行った。切断が完了した後、反応全体由来の物質が Capture Select ヒト IgG Fc 樹脂にアプライされ、Fab フラグメント、還元剤、および IDES 酵素を除かれて溶出された。

【0060】

溶出された Fc を、Fpn-1 についての上記の通り、ただし還元剤無しの反応において、His タグを付けた組換え IDES 酵素 (FabRICATOR とも称する) により切断した。これにより、結果としてヒンジ領域ペプチド (約 1096 Da) およびヒンジ領域ペプチドを欠いた Fc フラグメントが得られた。ヒンジ領域ペプチドをさらに単離するため、Fc を結合するように作用し、流出画分中に FabRICATOR 酵素とともに 1096 Da ペプチドを残す、Capture Select ヒト IgG Fc を再度使用した。

【0061】

ペプチド FabRICATOR 画分を、215 nm 検出で、Zorbax RRHD 300SB-C18 逆相カラムを使用する UHPLC システムにより分析した。合成 1096 Da ヒンジ領域ペプチドを方法対照として使用した。

【0062】

図 4 A のクロマトグラムは、アドセトリス、アバスチン、およびハーセプチンの製剤由来の 1096 Da ペプチドを示す。図 4 B のクロマトグラムは、合成ペプチドも示す。アドセトリスは、ヒンジ領域にも結合部位を有する抗体薬物複合体である。この製剤は、TCEP による還元後、ヒンジ領域の結合変異体として同定される、2 つのさらなるピークにより際立っている。

配列表

【0063】

10

20

30

【化2】

配列番号1

DQN FARNEKEAKDGAITFIQKSAAIKAGARSAEDIKLDKVNLGGELSGSNMYVYNISTGGFIVSGDKRSPEILGYSTS
 FDANGKENIASFMESYVEQIKENKLDTTYAGTAEIKQPVVKSLLDKGIGHYQGNPYNLLTPVIEKVKPGEQSFVGQHAA
 TGCVATATAQIMKYHNPNGKGLDYTYTLSSNNPYFNHPKNLFAAISTRQYNWNNILPTYSGRESNVQKMAISELMADVG
 SVMDYGPSSGSAGSSRVQRALKENFGYNQSVHQINRSDFSKQDWEAQIDKELSQNQPVYYQGVGKVGHHAFVIDGADGRN
 FYHVNWGWGGVSDGFFRLDALNPSALGTGGGAGGFNGYQSAVVGKIP

配列番号2

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTWSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQ
 KDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDLSKLFYFKEAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNH
 GPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFD
 SNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKYFVGVSAGKVAISAKEIKEADNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

10

配列番号3

CPPCPAPELLG

配列番号4**KTHTCPPCPAPELLGGPSVF**

20

配列番号5

MADQN FARNEKEAKDASITFIQKSAAIKAGARSAEDIKLDKVNLGGELSGSNMYVYNISTGGFIVSGDKRSPEILGYSTS
 GSFDANGKENIASFMESYVEQIKENKLDTTYAGTAEIKQPVVKSLLDKGIGHYQGNPYNLLTPVIEKVKPGEQSFVGQH
 AATGCVATATAQIMKYHNPNGKGLDYTYTLSSNNPYFNHPKNLFAAISTRQYNWNNILPTYSGRESNVQKMAISELMAD
 GISVMDYGPSSGSAGSSRVQRALKENFGYNQSVHQINRSDFSKQDWEAQIDKELSQNQPVYYQGVGKVGHHAFVIDGADG
 RNFYHVNWGWGGVSDGFFRLDALNPSALGTGGGAGGFNGYQSAVVGKIP

配列番号6

MRKRCYSTSAAVLAATLFLVLSVDRGVIADSFSAQNEIRYSEVTPYHVTWSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWY
 DITKTNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDLSKLFYFKEKA
 FPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDKEKNLKEISDLIK
 KELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKYFVGVSAGKVAISAKEIKEADNIGA
 QVLGLFTLSTGQDSWNQTN

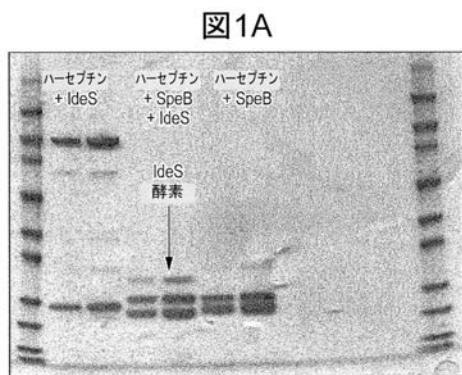
30

配列番号7

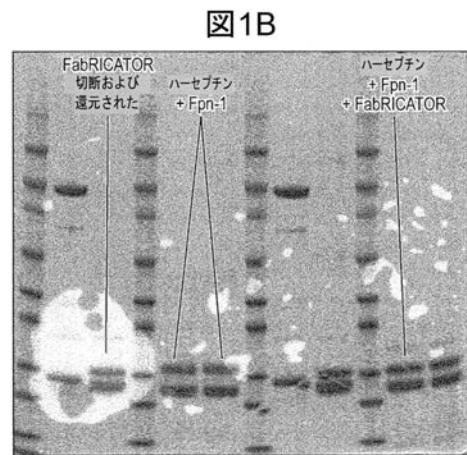
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL
 QMNSLRAEDTAVYYCISRGGDGFYAMDYWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHPNSTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPCPAELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPV
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

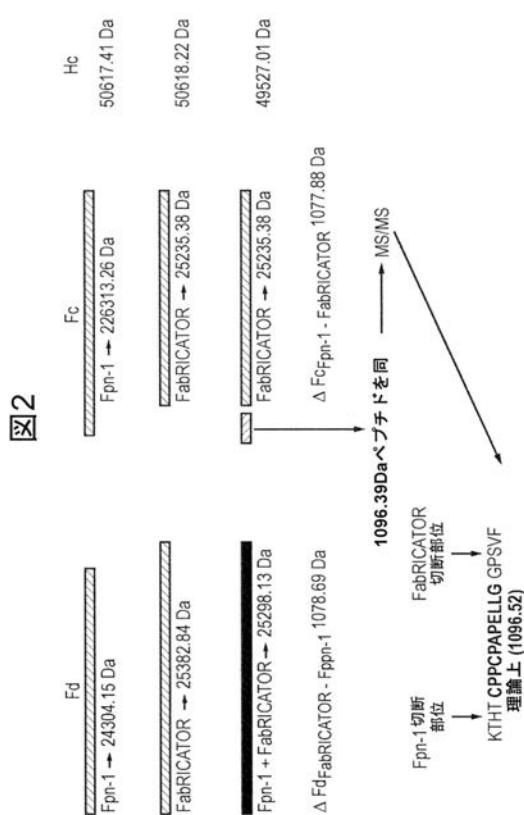
【図 1 A】



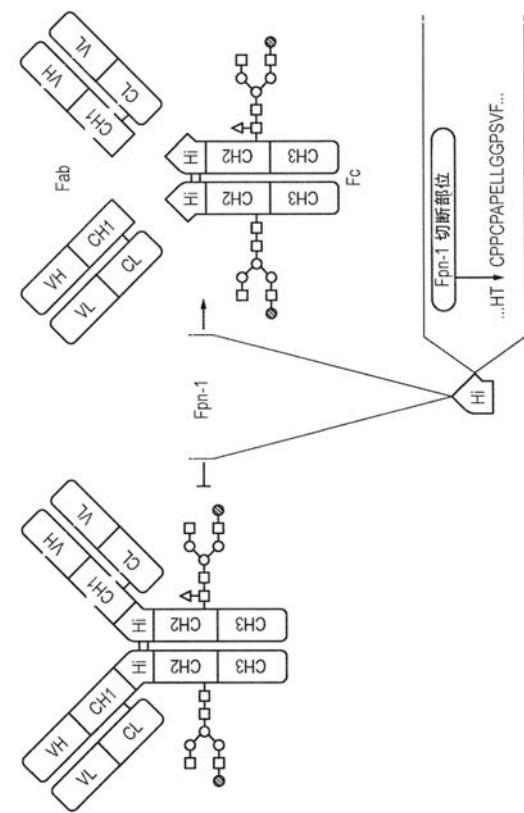
【図 1 B】



【図 2】



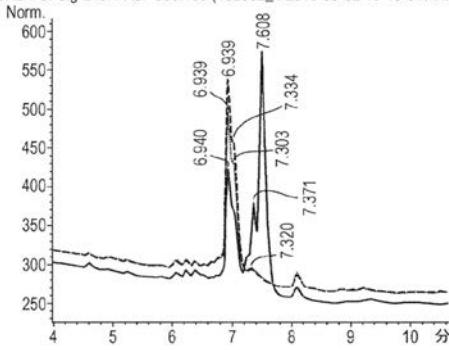
【図 3】



【図4A】

図4A

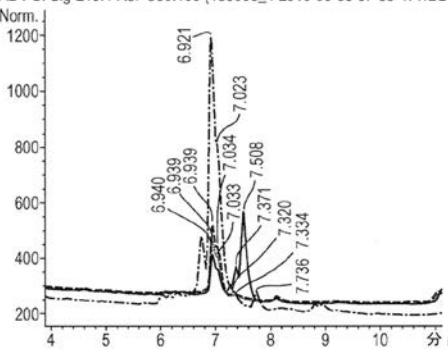
— DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AB-1901.D)
 — DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AD-2101.D)
 - - - DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AF-2401.D)



【図4B】

図4B

— DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AB-1901.D)
 — DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AD-2101.D)
 - - - DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130902_1 2013-09-02 15-15-04)1AF-2401.D)
 - - - DAD1 C. Sig-215.4 Ref=360.100 (130903_1 2013-09-03 07-35-17)1BB-0301.D)



【配列表】

2016531546000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/069920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 C12N9/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12N

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/237784 A1 (VON PAWEL-RAMMINGEN ULRICH [SE] ET AL) 11 October 2007 (2007-10-11) abstract, figure 1, paragraph [0194] -----	1,3,5,9, 11,18
X	US 5 965 709 A (PRESTA LEONARD G [US] ET AL) 12 October 1999 (1999-10-12) sequence 57 -----	16,17
X	WO 2013/033008 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS INC [US]; HARMS BRIAN [US]; KOHLI NEERAJ [US]) 7 March 2013 (2013-03-07) sequence 23 ----- -/-	16,17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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

Date of mailing of the international search report

7 January 2015

16/01/2015

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

Lindberg, Pia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/069920

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Randall J. Brezski ET AL: "Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases", mAbs, vol. 2, no. 3 1 May 2010 (2010-05-01), pages 212-220, XP055158873, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881249/pdf/mabs0203_0212.pdf [retrieved on 2014-12-16]</p> <p>figure 1; table 1</p> <p>-----</p>	2,4,6-8, 10,12-15
Y	<p>ERIKSSON: "Cleavage of Antigen-Bound Immunoglobulin G by SpeB Contributes to Streptococcal Persistence in Opsonizing Blood", INFECT. IMMUN., vol. 71, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 211-217, XP055107650, abstract, page 213, left-hand column</p> <p>-----</p>	2,4,6-8, 10,12-15
Y	<p>Sandra Hermanto ET AL: "Preparation of F (ab') 2 trastuzumab fragment for Radioimmunoconjugate synthesis of 177 Lu-DOTA-F (ab') 2 - trastuzumab", IOSR Journal of Pharmacy, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 12-18, XP055158894, Retrieved from the Internet: URL:http://www.iosrphr.org/papers/v2i6/Part_1/C0261218.pdf [retrieved on 2014-12-16]</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	2,4,6-8, 10,12-15
Y	<p>YAMAGUCHI Y ET AL: "Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G - Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 181, no. 2, 26 April 1995 (1995-04-26), pages 259-267, XP004021214, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(95)00010-8</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	2,4,6-8, 10,12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/069920

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Mike Clark: "An alignment of IgG sequences from Human, Mouse and Rat Sequences Human IgG1", , 1 April 2002 (2002-04-01), XP055105427, Retrieved from the Internet: URL:http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/lecturenotes/handout1a.pdf [retrieved on 2014-03-04] the whole document -----</p>	1-18
X, P	<p>Genovis: "FabULOUS", , 29 October 2013 (2013-10-29), XP002733830, Retrieved from the Internet: URL:http://www.genovis.com/FabULOUS [retrieved on 2014-12-15] the whole document</p> <p>& Fredrik Olsson ET AL: "Initial Characterization of a Recombinantly Modified SpeB from S. pyogenes for Antibody Subunit Domain Generation", , 29 October 2013 (2013-10-29), XP055158910, Retrieved from the Internet: URL:http://www.genovis.com/CASSSpoter2013-CCreducedsize.pdf?v=1 [retrieved on 2014-12-15] the whole document -----</p>	1-18
X, P		1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/069920

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2007237784	A1	11-10-2007	AU	2002366285 A1		30-06-2003
			EP	1458861 A2		22-09-2004
			US	2005119464 A1		02-06-2005
			US	2007237784 A1		11-10-2007
			WO	03051914 A2		26-06-2003
US 5965709	A	12-10-1999		NONE		
WO 2013033008	A2	07-03-2013	AU	2012300279 A1		03-04-2014
			CA	2843158 A1		07-03-2013
			CN	103857700 A		11-06-2014
			EP	2748197 A2		02-07-2014
			KR	20140054268 A		08-05-2014
			US	2014294834 A1		02-10-2014
			WO	2013033008 A2		07-03-2013

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,R0,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 ノルドグレン, マリア

スウェーデン国 281 39 ハスレホルム, スニッカーレガタン 13

(72)発明者 メジャレ, マリン

スウェーデン国 247 94 ダルビー, ランナーブ 304

(72)発明者 フレデリクソン, サラ

スウェーデン国 247 53 ダルビー, ジョアン アケルマンス ヴァグ 2

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA20 DA37 FB05 FB06 JA01

4B063 QA18 QQ79 QR16 QS16 QS40