

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6788010号
(P6788010)

(45) 発行日 令和2年11月18日 (2020. 11. 18)

(24) 登録日 令和2年11月2日 (2020. 11. 2)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68 Z N A
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 9 5
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N 9/52 (2006. 01)	C 1 2 N 9/52

請求項の数 17 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-530160 (P2018-530160)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成28年12月8日 (2016. 12. 8)		エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2019-506596 (P2019-506596A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成31年3月7日 (2019. 3. 7)		E AKTIENGESSELLSCHAF
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/080292		T
(87) 国際公開番号	W02017/097918		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(87) 国際公開日	平成29年6月15日 (2017. 6. 15)		グレンツァーヘルストラツセ１２４
審査請求日	令和1年11月25日 (2019. 11. 25)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	15198582.7		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成27年12月9日 (2015. 12. 9)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビボ相互作用様式を決定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用を決定するための方法：

1) 該多量体抗原に対する該抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 該抗体をFabおよびFc領域に切断するために、該抗体と、該抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリス (porphyromonas gingivalis) のリジン・ジンジパインまたはその酵素活性フラグメントとを含む混合物を、7.5～8.5のpH、還元剤の存在下、30℃～42℃の温度で、10分間～240分間の期間、インキュベートして、それによって該抗体の濃度を該抗原の濃度よりも高くし、そして該多量体抗原に対する該抗体のFabの結合親和性を決定する工程、

ならびに

該多量体抗原に対する該抗体の結合親和性を、両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であると決定し、両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型であると決定する工程。

【請求項 2】

以下の工程を含む、ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用を決定するためのアッセイ形式を選択するための方法：

1) 表面プラズモン共鳴法を用いて該多量体抗原に対する該抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 該抗体をFabおよびFc領域に切断するために、該抗体と、該抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインまたはその酵素活性フラグメントとを含む混合物を、7.5～8.5のpH、還元剤の存在下、30℃～42℃の温度で、10分間～240分間の期間、インキュベートして、それによって該抗体の濃度を該抗原の濃度よりも高くし、そして前の工程で得られたインキュベートされた反応混合物を表面プラズモン共鳴法に直接適用することによる表面プラズモン共鳴を用いて、それらの抗原に対する該抗体のFabの結合親和性を決定する工程であって、

ここで、該多量体抗原に対する該抗体の結合親和性は、i) 両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であり、またはii) 両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型である、工程、

10

ならびに、

該ヒトIgG1サブクラスの抗体と該多量体抗原との結合相互作用を決定するために、

i) 可溶性多量体抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、

ii) 可溶性多量体抗原とのアビディティ型相互作用の場合、溶液または表面アッセイを、

、

iii) 表面結合抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、または

iv) 表面結合抗原とのアビディティ型相互作用の場合、表面アッセイを、

選択する工程。

【請求項3】

結合親和性が、ELISAまたは表面プラズモン共鳴法を用いて溶液中で決定される、請求項1記載の方法。

20

【請求項4】

結合親和性が、FACSまたは細胞効果を用いる細胞アッセイを用いて決定される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

工程1) および2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性が2倍またはそれ未満相違する（小さい方の値をこの計算の基準として使用する）場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性が2倍超相違する（小さい方の値を100%とする）場合、相違する、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

30

結合親和性が、10またはそれ以上の抗体：多量体抗原比を用いて決定される、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドが、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインである、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドが、SEQ ID NO:02もしくはSEQ ID NO:03もしくはSEQ ID NO:04のアミノ酸配列またはその機能的変種を含む、請求項7記載の方法。

40

【請求項9】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドが、SEQ ID NO:01の少なくとも残基230～739を含むアミノ酸配列を有する、請求項7～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

還元剤が、2-メルカプトエタノール、システインおよびジチオトレイトールからなる群より選択される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

還元剤が、システインである、請求項10記載の方法。

【請求項12】

50

還元剤が、0.5 mM～10 mMの濃度のシステインである、請求項10～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

pH値が、約pH 8である、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 4】

温度が、35℃～38℃である、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 5】

インキュベーションが、約60分間の期間行われる、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

インキュベートされた混合物が、中間精製を行わずに、結合親和性の決定のために使用される、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 7】

結合親和性の決定が、表面プラズモン共鳴によるものである、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、免疫アッセイの分野に属する。特に、本明細書には、その各標的への治療結合体（薬物）の相互作用様式、すなわち親和性またはアビディティを適切に反映する結合アッセイの選択のための方法が報告されている。これは、治療結合体（薬物）の結合強度を反映する結合アッセイの選択に関連する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

バイオ医薬品の質は、その作用と共に、極めて重要である。したがって、その作用様式の精緻な調査に加えて、タンパク質ベースの薬物の正体、純度および活性を決定することが、それらを治療剤として安全に使用するために絶対的に必要となる。

【0 0 0 3】

モノクローナル抗体（mAb）は様々な分離および試験技術によって首尾よく分析することができる。

【0 0 0 4】

システインプロテアーゼであるパパインは、比較的非特異的にアルギニン（R）、リジン（K）、グルタミン酸（E）、ヒスチジン（H）、グリシン（G）およびチロシン（Y）の後ろでペプチド結合を切断する。インキュベーション期間が十分に長い場合、パパイン消化は、完全な加水分解をもたらす。しかし、限定的なタンパク質分解により、抗体は、それらのヒンジ領域において比較的选择的に切断されることができる（Lottspeich, F., and Engels, J.W., "Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag" Munich 2nd Edition (2006) 201-214（非特許文献1））。切断は、2つの重鎖をひとつに接続しているジスルフィド架橋のN末端側で起こる。ジスルフィド架橋は、このプロセスにおいて維持され、消化後に3つのフラグメント（2つのFabフラグメント、1つのFcフラグメント）が得られる。2つのN末端フラグメントは、抗原結合フラグメント（Fab、抗原結合フラグメント）と呼ばれ、C末端フラグメントは、結晶フラグメント（Fc、結晶フラグメント）と呼ばれる。各Fabフラグメントは、完全な軽鎖および重鎖のアミノ末端側半分から構成される。Fcフラグメントは、ジスルフィド架橋によって依然としてひとつに連結されている重鎖の2つのカルボキシ末端側半分から構成される。

【0 0 0 5】

近年、様々なIgG特異的プロテアーゼが同定された。

【0 0 0 6】

WO 2015/40125（特許文献1）では、連鎖球菌発赤毒素B（SpeB）が報告されている。そ

10

20

30

40

50

れは、IgGをそのヒンジ領域において切断し、2つの安定な単量体Fabフラグメントと1つのFcフラグメントとにすることが示されている、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*streptococcus pyogenes*) 由来のシステインプロテアーゼとして記載されている。さらに、SpeBが、Kabat番号体系にしたがう238位と239位との間 (EU番号体系にしたがう225位と226位との間) でIgGのヒンジ領域を切断することが報告されている。

【0007】

Mac-1またはsib-38とも呼ばれるヒト病原菌ストレプトコッカス・ピオゲネス由来のシステインエンドプロテアーゼIdeS (免疫グロブリン分解酵素S) は、免疫グロブリンG型 (IgG) の抗体の重鎖を特異的に切断するシステインプロテアーゼである。IgGは、これまでのところ、IdeSの唯一の判明している基質である (Vincent, B., et al., *Biochem. J.* 43 (2004) 15540-15549 (非特許文献2))。IdeSは、アミノ酸214~216によってRGDモチーフを形成する、29アミノ酸を含むシグナルペプチドを含む339アミノ酸からなる (von Pawel-Rammingen, U., et al., *EMBO J.* 21 (2002) 1607-1615 (非特許文献3))。IdeSは、そのヒンジ領域において、その認識配列LLGGPに含まれるKabat番号体系にしたがう249位と250位との間 (EU番号体系にしたがう236位と237位との間) (Gly-Gly) でヒトIgG (クラスG免疫グロブリン) を切断する。ヒトIgG2は、認識モチーフPVAGPにおけるアミノ酸アラニンとグリシンとの間で切断される。IgG2aおよびIgG3型のマウス抗体もまた切断される (Vincent, B., et al., *Biochem. J.* 43 (2004) 15540-15549 (非特許文献2))。

【0008】

ポルフィロモナス・ジンジバリスは、進行性歯周病の主要な病因である (例えば、Kadowaki, T., et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 21371-21378 (非特許文献4) を参照のこと)。そこから、様々な酵素、特にチロシン様システインプロテアーゼであるジンジパインが単離された。

【0009】

Kikuchi, Y., et al. は表面プラズモン共鳴を使用する抗体フラグメントの濃度および結合親和性の決定を報告した (*J. Biosci. Bioeng.* 100, (2005) 311-317 (非特許文献5))。

【0010】

WO 95/11298 (特許文献2) では、実質的に純粋なLys-ジンジパイン複合体調製物が提供され、Lys-ジンジパインは、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によって見積もられた見かけ上の分子量105 kDaを有することにより特徴づけられ、サンプルは、煮沸を行わずに調製され、このLys-ジンジパインは、リジン残基の後ろでの切断に関してアミド分解およびタンパク質分解活性を有し、アルギニン残基の後ろでの切断に関してはアミド分解および/またはタンパク質分解活性を有さず、このアミド分解および/またはタンパク質分解活性は、ヨードアセトアミドおよびヨード酢酸を含むシステインプロテアーゼ群特異的な阻害剤であるTLCKによって阻害され、このLys-ジンジパインのアミド分解および/またはタンパク質分解活性は、ロイペプチン、アンチパイン、トランス-エポキシスクシニル-L-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン、ジイソプロピルフルオロホスフェートおよびフッ化フェニルメチルスルホニルを含むセリンプロテアーゼ群特異的な阻害剤、ならびにLys-ジンジパイン複合体およびその触媒性成分に特異的な抗体による阻害に対して感受性がない。

【0011】

WO 2015/086549 (特許文献3) では、二価二特異性抗体の生物学的活性の決定のための、固体表面への二価二特異性抗体の固定化のためのその抗原との相互作用についてより小さなKD値 (解離定数) を有する二価二特異性抗体の結合アッセイの使用が報告されている。

【0012】

Inagaki, S., et al. は、ポルフィロモナス・ジンジバリスのジンジパインに対する歯周炎患者の抗体応答について報告した (*J. Periodont.* 74 (2003) 1432-1439) (非特許文献6)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】 WO 2015/40125

【特許文献2】 WO 95/11298

【特許文献3】 WO 2015/086549

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】 Lottspeich, F., and Engels, J.W., "Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag" Munich 2nd Edition (2006) 201-214

10

【非特許文献2】 Vincents, B., et al., Biochem. 43 (2004) 15540-15549

【非特許文献3】 von Pawel-Rammingen, U., et al., EMBO J. 21 (2002) 1607-1615

【非特許文献4】 Kadowaki, T., et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 21371-21378

【非特許文献5】 Kikuchi, Y., et al., J. Biosci. Bioeng. 100, (2005) 311-317

【非特許文献6】 Inagaki, S., et al., J. Periodont. 74 (2003) 1432-1439

【発明の概要】

【0015】

本明細書には、多特異性結合体、例えば二特異性抗体の（機能的）結合免疫アッセイの選択のための方法が報告されている。二特異性分子の機能的評価は、標準的な抗体と比較して付加的な局面を考慮する必要がある、すなわち、アッセイ形式は、個々の標的に対するインビボでの相互作用を反映するものであるべきであり、その薬物の結合部位を考慮すべきである。この局面は、薬物の機能性を決定するため、および例えば正確な結合値の決定を可能にするまたは最適な薬物の同定を最大化する方針決定のための免疫アッセイの選択の指針となる。

20

【0016】

本明細書で報告される1つの局面は、以下の工程を含む、多量体抗原と該抗原に特異的に結合する少なくとも2つの結合部位を有するヒトIgG1サブクラスの抗体との結合相互作用を決定するための方法である：

1) 多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体とポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドとを含む混合物を、該抗体をFabおよびFc領域に切断するのに十分な条件下および期間インキュベートし、そして多量体抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程、
ならびに

30

多量体抗原に対する抗体の結合親和性を、両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であると決定し、両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型であると決定する工程。

【0017】

本明細書で報告される1つの局面は、以下の工程を含む、ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用を決定するための方法である：

1) 多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体をFabおよびFc領域に切断するために、抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインまたはその酵素活性フラグメントとを含む混合物を、7.5~8.5のpH、還元剤の存在下、30℃~42℃の温度で、10分間~240分間の期間、インキュベートして、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして多量体抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程、
ならびに

40

多量体抗原に対する抗体の結合親和性を、両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であると決定し、両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型であると決定する工程。

【0018】

50

本明細書で報告される1つの局面は、以下の工程を含む、ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用を決定するためのアッセイ形式を選択するための方法である：

1) 表面プラズモン共鳴法を用いて多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体をFabおよびFc領域に切断するために、抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインまたはその酵素活性フラグメントとを含む混合物を、7.5～8.5のpH、還元剤の存在下、30℃～42℃の温度で、10分間～240分間の期間、インキュベートして、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして前の工程で得られたインキュベートされた反応混合物を表面プラズモン共鳴法に直接適用することによる表面プラズモン共鳴法を用いて、それらの抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程であって、

ここで、多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、i) 両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であり、ii) 両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型である、工程、
ならびに

ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用の決定のために、

i) 可溶性多量体抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、

ii) 可溶性多量体抗原とのアビディティ型相互作用の場合、溶液または表面アッセイを、

iii) 表面結合抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、または

iv) 表面結合抗原とのアビディティ型相互作用の場合、表面アッセイを、
選択する工程。

【0019】

1つの態様において、結合親和性は、酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) または表面プラズモン共鳴法を用いて溶液中で決定される。

【0020】

1つの態様において、結合親和性は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) または細胞効果を用いる細胞アッセイを用いて決定される。

【0021】

1つの態様において、工程1) および2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性が100%またはそれ未満相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性が100%超相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、相違する。

【0022】

1つの態様において、工程1) または2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性が2倍またはそれ未満相違する (小さい方の値をこの計算の基準として使用する；これを100%とする) 場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性が2倍超相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、相違する。

【0023】

1つの態様において、工程1) および2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性の比が1.5～0.5の間である (工程1) の値が分母であり、工程2) の値が分子である) 場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性の比が0.5未満である場合、相違する。

【0024】

1つの態様において、工程1) および2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性が75%またはそれ未満相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性が75%超相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、相違する。

【0025】

1つの態様において、結合親和性は、10またはそれ以上の抗体：多量体抗原比を用いて（インビボ様条件下で）決定される。

【0026】

1つの態様において、結合親和性は、1未満の、結合部位に対する多量体抗原のモル比で決定される。

【0027】

1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインである。1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、SEQ ID NO:02もしくはSEQ ID NO:03もしくはSEQ ID NO:04のアミノ酸配列またはその機能的変種を含む。1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、SEQ ID NO:02もしくはSEQ ID NO:03もしくはSEQ ID NO:04のアミノ酸配列を有するまたはその機能的変種である。1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、SEQ ID NO:01の少なくとも残基230～739を含むアミノ酸配列を有する。

10

【0028】

1つの態様において、抗体をFabおよびFc領域に切断するためのインキュベートは、（pH）7.5～（pH）8.5のpH、還元剤の存在下、30℃～42℃の温度で、10分間～240分間の期間である。

【0029】

20

1つの態様において、還元剤は、2-メルカプトエタノール、システインおよびジチオトレイトールからなる群より選択される。1つの態様において、還元剤は、システインである。1つの態様において、還元剤は、0.5 mM～10 mMの濃度のシステインである。

【0030】

1つの態様において、pH値は、約pH 8である。

【0031】

1つの態様において、温度は、35℃～38℃である。

【0032】

1つの態様において、インキュベートは、約60分間の期間行われる。

【0033】

30

1つの態様において、前記抗体は、両重鎖ポリペプチドにおいて、そのFc領域に、変異P329G、L234AおよびL235Aを含む。

【0034】

すべての局面の1つの態様において、インキュベートされた混合物は、中間精製を行わずに、結合親和性の決定のために使用される。

【0035】

すべての局面の1つの態様において、結合親和性の決定は、表面プラズモン共鳴による。

【図面の簡単な説明】

【0036】

40

【図1】決定木。

【図2】ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを用いて37℃で1時間消化されたベバシズマブのUHR ESI-QTOF質量分析である。FabおよびFcフラグメントのみが検出された。

【図3】パパイインを用いて37℃で1.5時間消化されたベバシズマブのUHR ESI-QTOF質量分析である。FabおよびFcフラグメント以外に、いくつかのFabおよび抗体フラグメントが検出された。

【図4】パパイインを用いて37℃で2時間消化されたベバシズマブのUHR ESI-QTOF質量分析である。いくつかの抗体フラグメントが検出された。FabおよびFcフラグメントは確認できなかった。

50

【図5-1】ベバシズマブの表面プラズモン共鳴センサグラムである。

【図5-2】組み換えベバシズマブFabの表面プラズモン共鳴センサグラムである。

【図5-3】ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを用いて消化されたベバシズマブの表面プラズモン共鳴センサグラムである。

【図5-4】ベバシズマブ、パパインを用いて消化しその消化を終了させなかったベバシズマブ、およびパパインを用いて消化しその消化を終了させたベバシズマブの表面プラズモン共鳴センサグラムである。

【図6】インビボ相互作用様式での標的結合における第2の結合部位の関与の分析結果。

【図7】インビボ相互作用様式での標的結合における第2の結合部位の関与の分析結果。

【発明を実施するための形態】

10

【0037】

発明の詳細な説明

本発明は、(機能的)免疫アッセイの分野に属する。特に、本明細書には、治療薬の結合強度を適切に反映する(機能的)結合アッセイの選択のための方法が報告されている。治療的に意味のある相互作用は通常、標的濃度が治療薬の濃度よりも低い(またはほぼ同じである)条件下で生じる。この(濃度)条件下でのポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによる消化は、特定の標的に対する治療薬の治療的に意味のある相互作用(親和性またはアビディティ)の決定を可能にする。これは、各標的の存在下を意味する。この例(一価結合体の使用)は、多量体(例えば、二量体)可溶性標的または細胞表面標的に必要とされるのみである。

20

【0038】

それぞれの決定に関して、親和性型相互作用様式は、溶液アッセイを必要とし、アビディティ型相互作用は、表面アッセイを必要とする。誤ったアッセイ形式の適用は、誤ったアッセイ結果をもたらすであろう。

【0039】

機能的アッセイは、治療分子を分析するために使用される。機能的アッセイが標的に対する薬物のインビボ結合強度を示そうとする場合、このインビボ相互作用様式(親和性またはアビディティ)がインビトロの機能的アッセイにおいて反映されていることを確実にすることが求められる。これは特に、薬物が特定の標的に対して二価(多価)である場合に関係する。その相互作用様式を評価する1つのアプローチは、タンパク質分解消化による一価薬物の生成ならびにインビボ状況を表す設定下での消化の前および後の結合強度を比較することである。しかし、プロテアーゼ、依然として二価(多価)である完全に消化されていない薬物、および部分的にしか消化されていない薬物はアッセイ結果を妨害するので、これは典型的に、消化された一価薬物の精製を必要とする。

30

【0040】

まとめると、使用されるプロテアーゼは、高度に特異的かつ定量的に薬物を切断する。したがって、薬物の結合強度は、精製を行うことなく消化前および後に評価することができる。非消化薬物と比較して消化により結合強度が低下することは、アビディティ(avid)結合様式を示す。消化の前後で差がない場合、結合様式は親和性(affine)である。決定された結合様式(親和性またはアビディティ)を機能的アッセイにおいて維持することは、インビボ結合強度を示すアッセイ結果を得るために重要である。また、決定された結合様式(親和性またはアビディティ)をアッセイ間で維持することは、比較可能なアッセイ結果を得るために必要とされる。

40

【0041】

定義：

相互作用様式は、親和性型またはアビディティ型のいずれかであり得る。相互作用様式の尺度は、結合強度である。

【0042】

標的および抗原という用語は、本明細書で言い換え可能に使用される。

【0043】

50

治療分子、薬物、抗体および二特異性分子という用語は、本明細書で言い換え可能に使用される。

【0044】

本明細書で使用される場合、重鎖および軽鎖のすべての定常領域およびドメインのアミノ酸位置は、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されるKabat番号体系にしたがい番号がつけられており、これは本明細書で「Kabatにしたがう番号」と称される。詳細には、カップおよびラムダアイソタイプの軽鎖定常ドメインCLについては、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のKabat番号体系(647~660頁を参照のこと)が使用され、定常重鎖ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2およびCH3、本明細書において、これらは本明細書で「Kabat EUインデックスにしたがう番号」を参照することによってさらに明確にされる)については、Kabat EUインデックス番号体系(661~723頁を参照のこと)が使用されている。

【0045】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈がそれ以外のことを明確に示していない限り、複数形の言及を包含することに留意されなければならない。したがって、例えば、「細胞(a cell)」の言及は、複数のそのような細胞および当業者に公知のその等価物等を包含する。同様に、「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つまたは複数」および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用され得る。「含む(comprising)」、「含む(including)」および「有する(having)」という用語も言い換え可能に使用され得ることに留意されたい。

【0046】

「約」という用語は、その後に続く数値の+/-20%の範囲を意味する。1つの態様において、約という用語は、その後に続く数値の+/-10%の範囲を意味する。1つの態様において、約という用語は、その後に続く数値の+/-5%の範囲を意味する。

【0047】

「ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン」という用語は、ヒトIgG1およびIgG3サブクラスの重鎖を、Kabat番号体系にしたがう238位と239位との間(EU番号体系にしたがう225位と226位との間)で特異的に切断する、すなわち、ヒンジ領域アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF (SEQ ID NO: 05)

を2番目のアミノ酸残基の後ろで切断し、DK (SEQ ID NO:06) および

THTCPPCPAPELLGGPSVF (SEQ ID NO: 07)

というフラグメントを生成する、ポリペプチドを意味する。1つの態様において、このポリペプチド、すなわち、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、SEQ ID NO:02もしくはSEQ ID NO:03もしくはSEQ ID NO:04のアミノ酸配列またはその機能的変種を含む。1つの態様において、このポリペプチド、すなわち、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、SEQ ID NO:01の少なくとも残基230~739を含むアミノ酸配列を有する。「ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン」は、EC番号3.4.22.47を有し、ジンジパインK、KGP、Lys-ジンジパイン複合体、PrtPプロテイナーゼ、リジン特異的システインプロテアーゼ、リジン特異的ジンジパイン、リジン特異的ジンジパインKまたはリジン特異的ジンジパインプロテイナーゼとも呼ばれる。例示的なポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインの全長アミノ酸配列は、SEQ ID NO:01で示される。このポリペプチドは、リシル結合に対する高い特異性を有するエンドペプチダーゼである。このポリペプチドの酵素活性は、約30 2-メルカプトエタノール、約50 mMシステイン、約30 mMジチオトレイトール、約2 mM EDTA、約2 mM EGTAまたはグルタチオンの添加によって活性化される。それは、pH 6.5~pH 9.5のpH範囲で活性であり、免疫グロブリンの加水分解には約pH 7.5~約pH 8.5(好ましくは約pH 8.0)のpHが適す

る。例示的なIgG分解法において、以下の条件が使用される：IgG（終濃度15 μ M）、KGP（終濃度10 nM活性プロテアーゼ）、Tris緩衝液（0.1 mol/L、pH 8.0）、EDTA（終濃度1 mM）、L-システイン（終濃度2 mM）、37°C。ヒトIgGは、1か所で切断されるが、糖構造が取り除かれた場合、第2の切断が起こり得る。この酵素的切断は、カオトロピック試薬および／または界面活性剤が存在する場合、負の影響を受け得る。したがって、1つの態様において、方法は、方法で使用されるすべての溶液からカオトロピック試薬および／または界面活性剤を非存在にした条件下で行われる。

【0048】

「全長抗体」という用語は、2つのいわゆる軽鎖免疫グロブリンポリペプチド（軽鎖）および2つのいわゆる重鎖免疫グロブリンポリペプチド（重鎖）を含む抗体を意味する。全長抗体の重鎖および軽鎖免疫グロブリンポリペプチドの各々は、抗原と相互作用することができる結合領域を含む可変ドメイン（可変領域）（一般に、ポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含む。全長抗体の重鎖および軽鎖免疫グロブリンポリペプチドの各々は、定常領域（一般に、そのカルボキシル末端部分）を含む。重鎖の定常領域は、i) Fcガンマ受容体（Fc γ R）を有する細胞、例えば食細胞、またはii) Brambell受容体としても公知の胎児性Fc受容体（FcRn）を有する細胞、に対する抗体の結合を媒介する。それはまた、古典的補体系の因子、例えば（C1q）成分を含むいくつかの因子への結合も媒介する。抗体の軽鎖または重鎖の可変ドメインはさらに、異なるセグメント、すなわち、4つのフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（CDR）を含む。

【0049】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を表す、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少数存在し得る可能性のある自然発生的な変異を除いて、同一である。モノクローナルは、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる抗原部位（決定基またはエпитープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、その抗原上の単一の抗原部位に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体の混入なしに合成され得る点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の生成を要件とするものと解釈されるべきでない。

【0050】

抗体の「Fc領域」は、その抗体の抗原への結合に直接関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。重鎖の定常領域のアミノ酸配列に依存して、抗体（免疫グロブリン）は、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMのクラスに分類される。これらのクラスのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、すなわち、IgGではIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、またはIgAではIgA1およびIgA2にさらに分類される。抗体が属する免疫グロブリンクラスにより、免疫グロブリンの重鎖定常領域は、それぞれ、 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)および μ (IgM)と呼ばれる。本発明にしたがう抗体は、好ましくは、IgGクラスに属する。「抗体のFc領域」は、当業者に周知の用語であり、抗体のパパイン切断に基づき定義される。

【0051】

機能的アッセイ：

本発明は、免疫アッセイの分野に属する。特に、本明細書には、多特異性結合体、例えば二特異性抗体の、インビボ様アッセイの選択のための方法が報告されている。

【0052】

多特異性結合体は、複数の異なる相互作用パートナーに結合する分子であり、それによって各々の標的／相互作用パートナーは一価または多価的に結合され得る。例えば、二特異性結合体は、2つの異なる標的／相互作用パートナーに特異的に結合し、それによって各々の標的／相互作用パートナーは一価または二価的に結合され得る。例えば、抗体、例えばIgGクラスの全長抗体は、二価である。したがって、その親和性を決定する際、それは二価結合体のアビディティ効果を避けた「真の」親和性であるべきである。したがって

、二価または多価標的に結合する抗体の親和性および結合動態を決定するため、二価抗体を、抗原結合（Fab）フラグメント単位のような一価結合体に変換することが必要である。二価抗体の親和性の決定のための本発明の方法は、2工程法である：

1：分析対象の抗体の切断による一価結合体の生成、および

2：1の反応混合物の精製。

【0053】

あるいは、上記のアプローチに関して、Fabフラグメントを再クローニングおよび発現させることが可能であるが、これにはより長い時間およびより多くの労力が必要となる。

【0054】

多特異性結合体とその標的／相互作用パートナーの各々との相互作用強度を決定するために、標的／相互作用パートナーの各々に対する特異性および親和性を決定する個々のアッセイは、その多特異性結合体のすべての相互作用を完全に特徴づけるよう選択および実施される必要がある。

【0055】

以下では、そのコンセプトが、二特異性抗体を用いて概説されている。これは、例示として行われたものにすぎず、本発明の範囲を限定するよう解釈されるべきでなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。

【0056】

二特異性抗体は、第1の抗原に対する少なくとも1つの結合部位と第2の抗原に対する少なくとも1つの結合部位とを含む結合体である。

【0057】

二特異性抗体は、第1の抗原に対する1つの結合部位と第2の抗原に対する1つの結合部位とを含み得る。この例において、二特異性抗体は、その抗原の各々に対しては一価であり、全体としては二価である。したがって、多特異性結合体の最も単純な形態は、二価二特異性抗体である。この形式はまた、1+1形式としても示される。

【0058】

二特異性抗体はまた、第1の抗原に対する2つの結合部位と第2の抗原に対する1つの抗原部位とを含み得る。そのような二特異性抗体は、三価二特異性抗体である。この形式は、2+1形式としても示される。

【0059】

二特異性抗体はまた、第1の抗原に対する2つの結合部位と第2の抗原に対する2つの抗原部位とを含み得る。そのような二特異性抗体は、四価二特異性抗体である。この形式は、2+2形式としても示される。

【0060】

さらに、二特異性抗体は、全長抗体であり得る。「全長抗体」という用語は、2つのいわゆる抗体軽鎖ポリペプチド（省略形：軽鎖）と2つのいわゆる抗体重鎖ポリペプチド（省略形：重鎖）とを含む免疫グロブリンを意味する。全長抗体の抗体重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、可変ドメイン（可変領域）（一般に、ポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含む。全長抗体の抗体重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、定常領域（一般に、そのカルボキシル末端部分）を含む。重鎖の定常領域は、i) Fcガンマ受容体（FcγR）を有する細胞、例えば食細胞、またはii) Brambell受容体としても公知の胎児性Fc受容体（FcRn）を有する細胞、に対する抗体の結合を媒介する。それはまた、古典的補体系の因子、例えば（C1q）成分を含むいくつかの因子への結合も媒介する。抗体の軽鎖または重鎖の可変ドメインはさらに、異なるセグメント、すなわち、4つのフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（CDR）を含み、可変ドメイン内のその超可変領域を通じて抗原と相互作用する。抗体の重鎖可変ドメインと同族抗体の軽鎖可変ドメインとの対は、結合部位であることを示す。

【0061】

「溶液アッセイ」という用語は、治療薬、例えば抗体が固相上に固定され、標的が可溶性形態で（すなわち、可溶性標的として）適用されるアッセイを意味する。溶液アッセイ

10

20

30

40

50

はまた、標的が細胞の細胞質中に存在する細胞内アッセイであり得る。

【0062】

「表面アッセイ」という用語は、標的が固相上に存在し、治療薬、例えば抗体が可溶性形態で適用されるアッセイを意味する。固相は、免疫アッセイにおいて従来的に使用されている任意の固相または標的を発現する細胞の表面であり得る。

【0063】

本発明の根底にある決定木が図1に示されている。

【0064】

二特異性抗体が各抗原（標的／相互作用パートナー）に対して一価である場合、溶液アッセイまたは固相表面ベースのアッセイのいずれかを使用することができる。

10

【0065】

二特異性抗体がその抗原（標的／相互作用パートナー）に対して二価である場合、それは、抗原（標的／相互作用パートナー）の種類、すなわち、可溶性であるかまたは表面に結合されているか、に依存し、アッセイ形式は以下に示すように選択されるべきである：

単量体可溶性抗原（標的／相互作用パートナー）の場合、溶液アッセイのみを使用できる；

可溶性多量体抗原（標的／相互作用パートナー）との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイのみを使用できる；

可溶性多量体抗原（標的／相互作用パートナー）とのアビディティ型相互作用の場合、溶液または固体表面ベースのアッセイのいずれも使用できる；

20

表面結合抗原（標的／相互作用パートナー）との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイのみを使用できる；

表面結合抗原（標的／相互作用パートナー）とのアビディティ型相互作用の場合、固体表面ベースのアッセイのみを使用できる。

【0066】

したがって、この決定を行うために、二価である二特異性抗体と抗原（標的／相互作用パートナー）との相互作用を親和性型またはアビディティ型に分類する必要がある。

【0067】

「親和性型相互作用」という用語は、その強度が関心対象の標的／相互作用パートナーに対する結合体内の相互作用部位の数に依存しない、結合体とその標的／相互作用パートナーとの間の相互作用を意味する。したがって、親和性は、抗体とその抗原との間の単一の相互作用の強度を表す。IgGクラスの二価抗体は、2つの抗原結合部位を有し、アビディティは通常、複数の抗原結合部位が同時に、しばしば多量体構造の、標的抗原と相互作用する抗体相互作用において生じる。

30

【0068】

「アビディティ型相互作用」という用語は、その強度が関心対象の標的／相互作用パートナーに対する結合体内の相互作用部位の数に依存する、結合体とその標的／相互作用パートナーとの間の相互作用を意味する。したがって、抗体のアビディティは、複数の親和性の累積強度を表す。アビディティは通常、しばしば多量体構造の、複数の抗原結合部位が関与する相互作用に関連して得られる。抗体の親和性を決定するために、二価抗体を、抗原結合フラグメント（Fab）のような一価結合体に変換することが必要となる。

40

【0069】

二特異性抗体の親和性型相互作用は、二特異性抗体と関心対象の抗原（標的／相互作用パートナー）との相互作用強度の、関心対象の抗原（標的／相互作用パートナー）に対する抗体内の結合の数への依存性を分析することによって、アビディティ型相互作用から区別することができる。

【0070】

相互作用強度が結合部位の数に依存しない場合、その相互作用は、親和性型である。相互作用強度が結合部位の数に依存する場合、その相互作用はアビディティ型である。

【0071】

50

したがって、相互作用強度は二度、すなわち、二特異性抗体に関して一度、関心対象の抗原（標的／相互作用パートナー）に対して一価のみである二特異性抗体またはそのフラグメントに関して一度、決定される必要がある。

【0072】

様々な抗体フラグメントを以下に示す。

- F(ab')₂フラグメント：

F(ab')₂フラグメントは、約110 kDaの分子量を有し、ヒンジ領域ジスルフィド結合を通じて接続されたIgGクラスの全長抗体の2つの抗原結合部位を含み；Fc領域のすべてではないが大部分を含まない。

- Fab'フラグメント：

Fab'フラグメントは、約55 kDaの分子量を有し；F(ab')₂フラグメントのヒンジ領域ジスルフィド結合の還元によって形成され得；Fab'フラグメントは、遊離スルフヒドリル基を含み；F(ab')₂由来であるため、Fc領域のごく一部を含み得る。

- 抗原結合フラグメント - Fab：

Fabは、約50 kDaの分子量を有し；IgGおよびIgMクラスの抗体から得ることができる一価結合フラグメントであり；どちらも分子間ジスルフィド結合によって連結された重鎖および完全軽鎖のVHおよびCH1ドメインを含む。

- Fvフラグメント：

Fvフラグメントは、約25 kDaの分子量を有し；完全な抗原結合部位（VHドメインおよびVLドメイン）を含む最小の抗体フラグメントであり；FvフラグメントのVHおよびVLドメインは、非共有結合的相互作用によってひとまとめにされている。

- 「rIgG」フラグメント：

「rIgG」フラグメントは、（例えば、2-MEAを用いて）全長抗体のヒンジ領域ジスルフィド結合のみを還元することによって得られる半抗体を意味し；約75 kDaの分子量を有する。

- 結晶化フラグメント - Fcフラグメント：

Fcフラグメントは、約50 kDaの分子量を有し；全長抗体の重鎖のCH₂およびCH₃ドメインならびにヒンジ領域の一部を含み；その2つの鎖は、（ヒンジ領域における）1つまたは複数のジスルフィド結合によってひとまとめにされており；Fcフラグメントは、抗原に結合することができないが、全長抗体のエフェクター機能を担っている。

【0073】

特に好ましく、かつ一般的に使用されるのは、Fabである。

【0074】

一価フラグメントは、例えば、各Fabフラグメントの再クローニングおよび発現によって取得され得る。これは、時間および労力のかかるアプローチである。

【0075】

あるいは、一価結合体が生じるよう分析対象の抗体を切断することが可能である。これは、酵素的に行うことができる。

【0076】

多くの場合、Fabフラグメントは、ヒンジ領域の上または下で切断する、それぞれ、パインまたはペプシン等の非特異的プロテアーゼを用いたIgGの部分タンパク質分解消化によって生成される。このフラグメントは、重鎖を接続するジスルフィド結合を含むが、切断は、軽鎖と重鎖との間のジスルフィドの部位より下で起こる（Porter, 1959; Nisonoff et al., 1960; Akita and Nakai, 1993, Andrew and Titus, 2003; Mage, 1987; Zhao et al., 2009; Andrew, S.M. and J.A. Titus. 2003）。

【0077】

ペプシンで消化されたIgGは、F(ab')₂フラグメントを生じ、これはその後に穏やかに還元されてFab'フラグメントとなる。ヒンジ領域は、それが露出しフレキシブルである状態ではプロテアーゼの攻撃に対してより高感受性となる可能性が高い。その後、このフラグメントは、消化混合物から精製される。

【0078】

しかし、再現性の欠如、未切断IgGおよび過剰消化がしばしば問題となる。

【0079】

パパイン消化の場合、例えば、均質なFabを得ることが困難である（Parham, 1983; 1986; Mage, 1987）。固定化されたパパイン製品（例えば、パパインアガロース樹脂；例えば、Tischer, W., and V. Kasche, 1999; Lue, Q., et al. 2002を参照のこと）は、消化反応のより高い制御ならびに粗プロテアーゼ消化物からのFabおよびFcフラグメントの効率的な抽出を可能にするが、それでも精製は依然として必要とされる。

【0080】

単量体の抗原結合フラグメントを得る別のアプローチは、S. ピオゲネスの免疫グロブリンG分解酵素（IdeS）を用いた消化によるF(ab')₂フラグメントの生成、および2-メルカプトエチルアミン（2-MEA）を用いた穏やかな還元によるFab'フラグメントの生成を含む（von Pawel-Rammingen, U., et al. 2002 + 2003; Ishikawa, E. and S. Yoshitake, 1980; DeSilva, B. S., et al., 1995）。

【0081】

IgGクラスの抗体の2つの抗原結合ドメインはまた、IgGを2つの半IgG（rIgG；例えば、Billah, M. M., et al., 2010を参照のこと）に還元することによっても得ることができる。それは、特に2-MEA等の穏やかな還元剤を用いて、最もアクセス性が高くかつ還元が容易であるヒンジ領域のジスルフィド結合だけを選択的に還元することによる生成物である。

【0082】

最後に、Fabはまた、軽鎖および重鎖Fdフラグメント（VH-CH1）の組み換え発現によっても得ることができる（Zhao et al., 2009）。しかしこれは、例えば比較のために様々な異なるFabが必要とされる場合、時間および労力がかかる。

【0083】

質量分析により鎖集合を分析するためのhIgG1の40分間消化におけるエンドプロテイナーゼLys-Cを用いた限定的消化が、PCT/EP2015/057164に報告されている。この手法を用いて、Lys-Cはもっぱら、ヒンジ領域の上を一か所切断し、FabおよびFcフラグメントを生成する。

【0084】

IgGクラスの抗体の上部ヒンジ領域において選択的に切断するプロテアーゼは、S. ピオゲネス由来の連鎖球菌発赤毒素B（SpeB）である（von Pawel-Rammingen, U., et al. 2002）。このプロテアーゼは、消化された抗体の鎖間チオールを同時に還元する1~5 mMの範囲のDTTまたはTCEP等の還元剤を、活性のために必要とする（Persson, H., et al., 2013; www.genovis.com/fabulous）。

【0085】

IgG特異的プロテアーゼおよびそれらの切断部位を、以下の表に示す（Brezski, R.J. and Jordan, R.E., mAbs 2 (2010) 212-220も参照のこと）。

【0086】

10

20

30

プロテアーゼ	特異性	認識配列	フラグメント
プラスミン		DK↓THTCPPCPAPELLGGPSVF (SEQ ID NO: 05)	2xFab 1xFC
ポルフィロモナス・ ジンジバリスの リジン・ジンジパイン	ヒトIgG1 および IgG3、IgA	DK↓THTCPPCPAPELLGGPSVF	2xFab 1xFC
ヒト好中球 エラスターゼ		DKT↓HTCPPCPAPELLGGPSVF	2xFab 1xFC
パパイン	IgG、限定的 タンパク質 分解において のみ 特異的	DKTH↓TCPPCPAPELLGGPSVF	2xFab 1xFC
S. ピオゲネス由来 の連鎖球菌 発赤毒素B (SpeB)		DKTHT↓CPPCPAPELLGGPSVF	2xFd 2xLC 1xFC
S. オーレウス (S. aureus) 由来の グルタミルエンド ペプチダーゼI、 カテプシンG		DKTHTCPPCPAPE↓LLGGPSVF	1xF(ab') ₂
ペプシン	IgG1>IgG2	DKTHTCPPCPAPEL↓LGGPSVF	1xF(ab') ₂ 複数の HC-Fcフラ グメント
S. ピオゲネスの 免疫グロブリンG 分解酵素 (IdeS)		DKTHTCPPCPAPELLG↓GPSVF	1xF(ab') ₂ 2xHC-Fc

10

20

30

【0087】

P. ジンジバリスプロテアーゼは、30年以上前から研究されている。それらは、活性のために還元剤の存在を必要とするシステインプロテイナーゼとして同定された。それらのうちの1つが、システインプロテアーゼ ジンジパインK (EC.3.4.22.47) である。

【0088】

Scott et al.は、1993年にポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン (KGP) を精製した (Scott, C.F., et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 7935-7942) 。

40

【0089】

Scott et al.は、システイン、ジチオトレイトール、グルタチオンおよび2-メルカプトエタノールが、KGPの活性化に適した還元剤であることを同定した。

【0090】

KGPは、P1位にLysを有するペプチドを切断し、P2の残基は重要度が低いようである。しかし、P2がLysまたはArgによって占有されている場合、加水分解は阻止されるようである。KGPは、BSA、カゼイン、ヘモグロビン、酸溶解性ヒト胎盤I型コラーゲン、ヒトIgGおよびIgA等のタンパク質基質を加水分解することができる (Curtis, M.A., et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med. 12 (2001) 192-216) 。

50

【0091】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインのアミノ酸配列は、各ドメインの同定を含めて、Okamoto, K., et al. (J. Biochem. 120 (1996) 398-406) によって報告された。kgp遺伝子は、Slakeski, N., et al.によって報告され、アクセッション番号U75366およびAAB60809.1の下で寄託された (Oral Microbiol. Immunol. 14 (1999) 92-97)。様々なC末端短縮型であるが活性な形態が同定されている。C末端短縮タンパク質KGP(Δ 1292~1732)、KGP(Δ 1157~1732)、KGP(Δ 738~1732)、KGP(Δ 681~1732)およびKGP(Δ 602~1732)について、酵素活性は、最後の2つの変異体についてはかろうじて測定可能であるだけであることが見出されている (例えば、Sztukowska, M., et al., Mol. Microbiol. 54 (2004) 1393-1408を参照のこと)。

10

【0092】

KGPは、アルギニンおよびリジン残基をそれぞれ含むペプチド結合に限定される、合成基質に対する狭い特異性を有するが、それにもかかわらずそれらは、限定的な分解様式で免疫グロブリンGおよびAを分解することができる (Yamamoto, K., et al., In: *Proteases: new Perspectives* (1999), V. Turk (ed.), Birkhauser Verlag Basel (CH), 175-184; Yamamoto, K., et al., In: N Katunuma, H Kido, H Fritz, J Travis (Eds): *Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors*. IOS Press, Amsterdam, 139-149; Kadowaki, T., et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 21371-21378; Abe, N., et al., J. Biochem. 123 (1998) 305-312)。

【0093】

20

ポルフィロモナス・ジンジバリスのエンベロープ結合アルギニン・ジンジパイン (RGP) およびリジン・ジンジパイン (KGP) の特性の比較は、1998年にFujimura et al. (Microbiol. Lett. 163 (1998) 173-179) によって報告された。これらの酵素は共通して、還元剤、例えばメルカプトエタノール、ジチオトレイトールおよびシステインによって活性化された。RGP-Bは、グリシル・グリシンによって強く活性化され、KGPは、EDTAおよびEGTAによって有意に活性化された。発色合成基質に対するRGPおよびKGPの加水分解活性は、それぞれP1位にアルギニンおよびリジンを有する化合物に限定された。IgGを3つの酵素で別々に処理すると、各反応産物において34 kDaおよび15 kDa (還元条件下でのSDS) の2つの新しいフラグメントが生成されることが実証された。KGPの活性に関する至適pHは、7.5であることが見出された。チオール試薬は、RGPおよびKGPの両方を活性化させ、ジチオトレイトールは、(20~30 mMで) KGPの最良の活性化剤であり、それに続いて (20~30 mMの) メルカプトエタノールおよび (1.5 mM超であるが10 mM未満の) システインであった。KGPは、X-Y-Lys-pNAのみを分断した。

30

【0094】

Vincent, B., et al.は、ポルフィロモナス・ジンジバリスのジンジパインKがヒトIgGのサブクラス1および3を加水分解することができ、それによってIgG1の重鎖はそのヒンジ領域内の単一部位で切断され、FabおよびFcフラグメントを生成したこと、ならびにIgG3もまた、重鎖内であるが、CH2領域付近のいくつかの部位で切断されたことを報告した (FASEB J., 25 (2011) 3741-3750)。IgG2の切断は、KGPによって媒介されない (Guentsch, A., et al., J. Periodont. res. 48 (2013) 458-465)。

40

【0095】

KGPの活性部位の高解像度結晶構造は、de Diego, I., et al.,によって報告され、触媒作用が、システインペプチダーゼにおいて通常見出されるシステイン・ヒスチジンの2分子ではなく、触媒性3分子Cys477-His444-Asp388を必要とし得ることが示唆された (J. Biol. Chem. 289 (2014) 32291-32302)。

【0096】

本明細書で報告される方法

本明細書には、多量体標的／相互作用パートナーに対して1つまたは複数の結合部位を有する多特異性結合体のための (機能的) 免疫アッセイの高速かつ簡単な選択法が報告されている。

50

【0097】

この方法は、全長多特異性結合体と標的／相互作用パートナーに対して一価であるそのフラグメントとの間での結合強度の比較に基づく。

【0098】

必要とされる一価フラグメントは、例えば、Fabであり得る。Fabは、酵素消化によってIgG1サブクラスの全長抗体から得られる。ヒトIgG1サブクラスの抗体のヒンジ領域を含む全長抗体からのFabの生成に、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを使用することができるが見出された。この酵素を用いた場合、典型的に他のタンパク質分解酵素に付随する過剰消化を伴わずにインタクトなFabおよびFcフラグメントの均質なプールを生成する、高度に特異的かつ定量的なプロテアーゼ消化を達成することができる。さらに、その反応混合物は、直接、すなわち中間精製を行わずに、表面プラズモン共鳴チップに適用することができる。

10

【0099】

より詳細には、これは、溶液中消化および事前の精製または洗浄工程を行わないSPRによるFabフラグメントの直接的・速度論的親和性決定により行われる。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによるヒトIgG1の完全な消化を、ESI-QTOF-MSにより検証した。

【0100】

この消化方法は、表面プラズモン共鳴法を用いた、二量体または多量体抗原に特異的に結合する、例えばサブクラスIgG1のまたはヒトサブクラスIgG1由来のFc領域を含む、ヒトまたはヒト化抗体の動態速度定数の決定のために使用され得る。この方法は、1つの態様において、以下の工程を含む：1) FabおよびFcフラグメントの均質なプールを生成するよう抗体を完全に切断するように、抗体をポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインと共にインキュベートする工程、ならびに2) 表面プラズモン共鳴（SPR）により消化混合物中のFabの結合親和性を決定する工程。消化混合物に対する直接SPRは、事前の精製なしのFabフラグメントの正確な速度論的特徴づけを実現する。

20

【0101】

後続の精製を行わないポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを用いた消化により得られるIgG1サブクラスの抗体のFabの、SPRにより決定される親和性定数は、組み換え発現によりまたはパパイン消化しその後SPR測定前に精製することにより得られるFabの親和性定数に匹敵することが見出された。

30

【0102】

本明細書で報告される1つの局面は、以下の工程を含む、多量体抗原と、該抗原に特異的に結合する少なくとも2つの結合部位を有するヒトIgG1サブクラスの抗体との結合相互作用を決定するための方法である：

1) 多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドとを含む混合物を、該抗体をFabおよびFc領域に切断するのに十分な条件下および期間インキュベートし、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして多量体抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程、

40

ならびに
多量体抗原に対する抗体の結合親和性を、両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であると決定し、両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型であると決定する工程。

【0103】

本明細書で報告される1つの局面は、以下の工程を含む、多量体抗原と、該抗原に特異的に結合する少なくとも2つの結合部位を有するヒトIgG1サブクラスの抗体との結合相互作用を決定するためのアッセイ形式を選択するための方法である：

1) 多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来の

50

ポリペプチドとを含む混合物を、該抗体をFabおよびFc領域に切断するのに十分な条件下および期間インキュベートし、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして多量体抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程であって、

ここで、多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、i) 両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であり、ii) 両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型である、工程、

ならびに

ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との相互作用の決定のために、

i) 可溶性多量体抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、

ii) 可溶性多量体抗原とのアビディティ型相互作用の場合、溶液または表面アッセイを

10

、
iii) 表面結合抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、または

iv) 表面結合抗原とのアビディティ型相互作用の場合、表面アッセイを、

選択する工程。

【0104】

1つの態様において、結合親和性は、ELISAを用いて決定される。

【0105】

1つの態様において、結合親和性は、表面プラズモン共鳴法を用いて決定される。

【0106】

1つの態様において、工程1) および工程2) で同じアッセイが使用される。

20

【0107】

1つの態様において、結合親和性は、FACSまたは細胞効果を用いて決定される。

【0108】

「(抗原に) 特異的に結合する」という用語は、インビトロアッセイにおける、1つの態様においては、抗体を表面に結合させ、抗体に対する抗原の結合を表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定する結合アッセイにおける、抗体のその抗原に対する結合を意味する。特異的結合は、 10^{-8} Mまたはそれ未満の結合親和性 (K_D) を意味する。例示的なSPR法は、BIAcoreアッセイ (GE Healthcare AB, Uppsala, Sweden) である。結合の親和性は、 k_a (抗体/抗原複合体における抗体の結合についての速度定数)、 k_d (解離定数) および K_D (k_d/k_a) の各語によって定義される。同時に、抗原に結合しないという特性は、 10^{-7} mol/Lまたはそれより低い、例えば 10^{-5} mol/Lの K_D によって確認される。1つの態様において、抗体は、抗原に対する特異的結合と抗原に対する非特異的結合との間に少なくとも100倍の K_d ギャップを有する。

30

【0109】

1つの態様において、工程2) のインキュベートされた反応混合物は、表面プラズモン共鳴法に直接適用される。

【0110】

1つの態様において、工程1) および2) で決定された多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、両工程で決定された結合親和性が100%またはそれ未満相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、同等であり、両工程で決定された結合親和性が100%超相違する (小さい方の値を100%とする) 場合、相違する。

40

【0111】

1つの態様において、この方法は、以下の工程を含む：

1) 表面プラズモン共鳴法を用いて多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体をFabおよびFc領域に切断するために、抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドとを含む混合物を、pH 7.5~pH 8.5のpH、還元剤の存在下、30℃~42℃の温度で、10分間~240分間の期間、インキュベートして、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして前の工程で得られたインキュベートされた反応混合物を表面プラズモン共鳴法に直接適用することによる表面

50

プラズモン共鳴法を用いて、それらの抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程。

【0112】

1つの態様において、多量体抗原と、該抗原に特異的に結合する少なくとも2つの結合部位を有するヒトIgG1サブクラスの抗体との結合相互作用を決定するためのアッセイ形式を選択するための方法は、以下の工程を含む：

1) 表面プラズモン共鳴法を用いて多量体抗原に対する抗体の結合親和性を決定する工程、

2) 抗体をFabおよびFc領域に切断するために、抗体と、抗原と、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドとを含む混合物を、pH 7.5～pH 8.5のpH、還元剤の存在下、30℃～42℃の温度で、10分間～240分間の期間、インキュベートして、それによって抗体の濃度を抗原の濃度よりも高くし、そして前の工程で得られたインキュベートされた反応混合物を表面プラズモン共鳴法に直接適用することによる表面プラズモン共鳴法を用いて、それらの抗原に対する抗体のFabの結合親和性を決定する工程であって、

ここで、多量体抗原に対する抗体の結合親和性は、i) 両工程において決定された結合親和性が同等である場合、親和性型であり、ii) 両工程において決定された結合親和性が相違する場合、アビディティ型である、工程、
ならびに

ヒトIgG1サブクラスの抗体と多量体抗原との結合相互作用の決定のために、

i) 単量体可溶性抗原の場合、溶液アッセイを、

ii) 可溶性多量体抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、

iii) 可溶性多量体抗原とのアビディティ型相互作用の場合、溶液または表面アッセイを、

iv) 表面結合抗原との親和性型相互作用の場合、溶液アッセイを、または

v) 表面結合抗原とのアビディティ型相互作用の場合、表面アッセイを、
選択する工程。

【0113】

1つの態様において、インキュベートは、インビボ条件下で行われる。1つの態様において、インキュベートは、10またはそれ以上の抗体：多量体抗原比で行われる。1つの態様において、インキュベート工程における抗体の濃度は、抗原の濃度の少なくとも10倍である。

【0114】

1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインである。1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、SEQ ID NO:02もしくはSEQ ID NO:03もしくはSEQ ID NO:04のアミノ酸配列またはその機能的変種を含む。1つの態様において、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン由来のポリペプチドは、SEQ ID NO:01の少なくとも残基230～739を含むアミノ酸配列を有する。

【0115】

1つの態様において、還元剤は、2-メルカプトエタノール、システインおよびジチオトレイトールからなる群より選択される。1つの態様において、還元剤は、システインである。1つの態様において、還元剤は、0.5 mM～10 mMの濃度のシステインである。1つの態様において、還元剤は、約2 mMの濃度のシステインである。

【0116】

1つの態様において、pH値は、約pH 8である。

【0117】

1つの態様において、温度は、35℃～38℃の温度である。1つの態様において、温度は、約37℃である。

【0118】

1つの態様において、インキュベートする工程は、30分間～120分間の期間行われる。1つの態様において、インキュベートする工程は、約60分間の期間行われる。

【0119】

1つの態様において、抗体は、両重鎖ポリペプチドにおいて、そのFc領域内に、変異P329G、L234AおよびL235Aを含む。

【0120】

1つの態様において、抗原は、多量体抗原である。1つの態様において、抗原は、ホモ多量体抗原である。1つの態様において、抗原は、血管内皮成長因子A (VEGF-A)、癌胎児性抗原 (CEA)、アンジオポエチン-2 (ANG2) および線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) からなる群より選択される。

10

【0121】

本明細書に報告される方法は、二価抗体のその多量体抗原に対する結合親和性を、その抗体の単一結合部位版を組み換え生産する必要なしに素早く決定することを可能にする。本明細書に報告される方法を用いることで、二価抗体のその抗原に対する結合親和性の決定を、二価抗体のFabの生成に使用された反応混合物の中間精製を必要とせずに行うことができる。

【0122】

本明細書に報告される方法は、抗体ベバシズマブを用いて下記で例証されている。ベバシズマブは、ヒトIgG1サブクラスのヒト化抗VEGF抗体である。治療抗体ベバシズマブは、二量体抗原、すなわちVEGF-Aに結合する。

20

【0123】

ベバシズマブFabおよび消化物の質を、UHR ESI-QTOF質量分析によって分析した。パパイン消化後の精製されたFabおよび精製された組み換えFabのデコンボリューション質量スペクトルは、Fabフラグメントの質量のみが検出可能であったことから、両物質の高い質を証明した。

【0124】

より詳細には、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによるベバシズマブの完全消化を、サイズ排除クロマトグラフィーを用いた反応混合物の脱塩後にエレクトロスプレーイオン化質量分析によって検証した。MSスペクトルにおいて断片化または副産物は同定できなかった。

30

【0125】

比較のために、ベバシズマブを、酵素パパインを用いて消化した。MSスペクトルから、パパインは、この酵素を非特異的に断片化および機能喪失させるゆえに、機能的評価に適さないことを確認できる。

【0126】

それぞれのMSスペクトルが、図2 (ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによる1時間消化)、図3 (パパインによる1.5時間消化) および図4 (パパインによる2時間消化) に示されている。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを使用した際に、ヒンジ領域における単一の切断以外の抗体の断片化は起こらなかったことを確認できる。

40

【0127】

より詳細には、組み換えベバシズマブFabならびにパパインおよびポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン消化物の質を、UHR ESI-QTOF質量分析によって分析した。パパイン消化後の精製されたFabおよび精製された組み換えFabのデコンボリューション質量スペクトルは、それぞれ、48208 Da (理論上の平均質量: 48208 Da) および47726 Da (理論上の平均質量: 47726 Da) のインタクトなFabの質量のみが検出できたことから、両物質の高い質を明らかにした。パパインで消化されたベバシズマブの質量スペクトルの評価は、48207 Da Fab (理論上の平均質量: 48208 Da) およびFcフラグメント (Fc N-グリカンの不均質性に起因して複数の質量が存在した) の存在だけでないことを明らか

50

にした。加えて、パパイン消化物において、x：23422 Daおよび23453 Da、y：34587 Daならびにz：47607 Daの質量に対応する割り当て不可のフラグメントも検出された。これに対して、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインで消化されたベバシズマブのデコンボリューション質量スペクトルは、47969 Da Fab（理論上の平均質量：47970 Da）およびFcフラグメント（Fc N-グリカンの不均質性に起因して複数の質量が存在した）の存在のみを示した。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによる消化は完全なものであり、非消化または一か所切断IgG（1つのFabを有さないIgG）は質量分析により検出できなかった。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン消化の粗消化混合物において、このフラグメントの非特異的消化、過剰消化またはさらなる分解も検出できなかった。

10

【0128】

本明細書に報告される方法を、以下の様々なベバシズマブ由来サンプルを用いて実施した：

- 1) 全長二価抗体
- 2) 組み換え生成されたFab
- 3) （ポルフィロモナス・ジンジバリスの機能的なリジン・ジンジパインの存在下でのインキュベート後および24時間のさらなるインキュベート後に直接決定された）（中間精製なしで）本明細書に報告される方法を用いて生成されたFab
- 4) （反応停止なし、中間精製なしで）パパインを用いて生成されたFab
- 5) （反応停止あり、中間精製なしで）パパインを用いて生成されたFab
- 6) （中間精製ありで）パパインを用いて生成されたFab。

20

【0129】

異なる方法で生成されたベバシズマブのFabの親和性を比較するために、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインを用いて消化され、Fabの精製が行われなかったベバシズマブの結合親和性、および、組み換えにより一過的に発現されたベバシズマブFab、パパイン消化後の精製されたFabの結合親和性を決定した。

【0130】

親和性を決定するために、マウス抗Hisタグ抗体を固定し、Hisタグにコンジュゲートされた二量体VEGF-Aをセンサチップ表面に捕捉させた。その後、VEGF-Aに結合する分析物を注入し、表面上に流した。得られたセンサグラムを1：1ラングミュア結合モデルにフィットさせ、これを使用して結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d および結合定数 K_D を決定した。全体として、Fabフラグメントの速度および結合定数は、すべてで非常に類似していた（以下の表を参照のこと）。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン消化混合物中のFabの結合定数は、1.1 nMであることが見出され、組み換えFabおよびパパイン消化後の精製されたFabの結合定数は、それぞれ、0.8および1.0 nMであることが決定された。全長二価抗体の K_D は、0.18 nMであることが決定され、これにより二量体VEGF-Aに対するアビディティ（avid）結合が示された。しかし、パパイン消化混合物を固定したチップ表面に適用した場合、本発明者らは捕捉された二量体VEGF-Aへの結合を観察しなかった。その結果、パパイン消化混合物については結合定数を決定することができなかった。パパイン含有サンプルを適用した後にVEGF-A表面が損傷し、それ以上使用できなくなったことが見出された。

30

40

【0131】

結果を以下の表に示す。

サンプル	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [nM]
全長ベバシズマブ（アビディティ）	1.61E+05	2.96E-05	0.18
組み換えベバシズマブFab （親和性）	9.03E+04	7.37E-05	0.8
ポルフィロモナス・ジンジバリスの リジン・ジンジパインで消化された ベバシズマブ、精製なし （さらなるインキュベートなし）	5.18E+04	5.83E-05	1.1
パパイン消化されたベバシズマブ （反応停止なし、 中間精製なし）	結合シグナルが観察され なかったため決定できず		
パパイン消化されたベバシズマブ （反応停止あり、 中間精製なし）	結合シグナルが観察され なかったため決定できず		
パパイン消化されたベバシズマブ （中間精製あり）	7.95E+04	8.02E-05	1.0

【0132】

決定された結合親和性が、全長二価抗体と一価Fabとで同等でない（100%超異なる）ことから、ベバシズマブのその抗原に対する結合はアビディティ型であることが分かる。

【0133】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、ヒトIgG1に特異的なので、固定チップ表面を破壊しないことを観察することができる。これに対して、未精製パパイン消化反応混合物を固定チップ表面に適用した後に結合は観察されなかった。VEGF表面は、パパイン含有サンプルを適用した後、パパインの存在により損傷を受けたため、それ以上使用することができなくなった。

【0134】

それぞれのSPRダイアグラムを、図5-1～図5-4に示す。

【0135】

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインで消化したベバシズマブの保管およびSPRによる親和性決定の繰り返しから、この消化物が4℃でそれぞれ少なくとも24および48時間安定である、すなわちさらなる消化または断片化が起らなかった、という結論が導かれた。

【0136】

二量体または多量体抗原に結合するヒトIgG1の親和性の決定におけるポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインの使用とは別に、単量体抗原に結合するIgG1をSPR金属表面上に固定するのが困難である場合、プロテアーゼも使用することができる。

【0137】

加えて、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、例えばX線結晶解析による、Fabフラグメントの構造分析および原子解像度でのヒトIgG1-抗原結合の構造・機能関係に非常に有益であろう。IgGと比較すると、Fabフラグメントは、結晶化がより容易である。

【0138】

インビボ相互作用様式での標的結合における第2の薬物結合部位の関与を、細胞ベースのアッセイにおいて可溶性オリゴマー標的に結合するインタクトな二価モノクローナル抗体とポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインで消化された抗体とを比較することによって分析した。VEGF-Aは可溶性の二量体なので、ポルフィロモナス・ジンジ

10

20

30

40

50

パリスのリジン・ジンジパインによる消化の影響を、VEGF-A特異的な細胞ベースのレポーター遺伝子アッセイにおいて評価した。このアッセイでは、VEGF受容体2へのVEGF-Aの結合およびシグナル伝達を測定する。二価抗VEGF-A抗体、ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化された抗体、パパイソ消化によって得られた抗体の精製されたFabフラグメントおよびVEGF-A一価CrossMabを、試験および比較した。用量応答曲線は、すべての化合物で同等であり、インタクトな抗体、ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化された抗体、（パパイソ消化後に）精製されたFabおよびCrossMabで、それぞれ、1.2、10.3、10.4および12.1 nMのEC₅₀値であった。二価抗体のEC₅₀は、Fabフラグメントおよび一価CrossMabのそれよりも約9~10倍低い。したがって、二価抗VEGF-A抗体の2つの結合部位は、可溶性二量体VEGF-Aに対する結合強度（アビディティ）を増加させる。VEGF-Aに対する1つの結合部位を有するCrossMabは、Fabフラグメントと同等のEC₅₀（12.1対10.3~10.4 nM）を有する。ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパイン単独は、VEGF-Aの阻害を示さない（図6を参照のこと）。

【0139】

インビボ相互作用様式での標的結合における第2の薬物結合部位の関与を、細胞ベースのアッセイにおいて細胞表面に結合された標的に結合するインタクトなモノクローナル抗体とポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化されたモノクローナル抗体とを比較することによって分析した。癌胎児性抗原（CEA）等の多くの治療標的は、細胞表面に局在化している。細胞表面結合標的に特異的に結合する抗体に関するポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパイン消化を評価するため、抗CEA二価モノクローナル抗体、ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化された該抗体および該二価抗体のパパイソ消化によって得られた精製されたFabフラグメントを、Alexa Fluor 647標識抗ヒトカップ軽鎖検出抗体を通じてCEA発現胃腺癌細胞への結合を測定するフローサイトメトリーアッセイにおいて分析した。ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化された抗体および精製されたFabの完全性を、UHR-ESI-QTOF-MSによって確認した。二価抗体ではシグモイド型の用量応答曲線が得られ、ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパインで消化された抗体および精製されたFabでは直線的応答が得られたことは、この抗体の両結合部位が細胞表面標的の結合に関与し、高い結合強度（アビディティ）を示すことを実証している。無関係の標的に結合する抗体を用いた陰性対照では結合が検出されず、ポルフィロモナス・ジンジパリスのリジン・ジンジパイン単独でもそれは検出されなかった。

【0140】

組み換え法：

抗体は、例えばUS 4,816,567に記載される、組み換え法および組成物を用いて生産される。1つの態様において、本明細書に記載される抗体をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードし得る。さらなる態様において、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのそのような態様において、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターおよび抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、それらのベクターで形質転換されている）。1つの態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。1つの態様において、抗体の発現に適した条件下で、上で提供されるような、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養する工程、および任意で、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収する工程を含む、本明細書で報告される抗体を生産する方法が提供される。

【0141】

抗体の組み換え生産のために、例えば上記のような、抗体をコードする核酸が単離され

、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび／または発現のために1つまたは複数のベクターに挿入される。そのような核酸は、従来の手法を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定され得る。

【0142】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞は、本明細書に記載される原核生物または真核生物細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ない場合、細菌において生産され得る。細菌内での抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えば、US 5,648,237、US 5,789,199およびUS 5,840,523を参照のこと（大腸菌（*E. coli*）内での抗体フラグメントの発現について記載する、Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K. C (ed). Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照のこと）。発現後、抗体は、可溶性画分内の細菌細胞ペーストから単離され得、そしてさらに精製され得る。

10

【0143】

原核生物に加えて、そのグリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体を産生する真菌および酵母株を含む、真核微生物、例えば糸状菌または酵母も、抗体をコードするベクターに適したクローニングまたは発現宿主である。Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414；およびLi, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215を参照のこと。

【0144】

グリコシル化された抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。特にスポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクトのために昆虫細胞と組み合わせて使用され得る多くのバキュロウイルス株が同定されている。

20

【0145】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用され得る。例えば、（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術について記載する）US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978およびUS 6,417,429を参照のこと。

【0146】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁下で増殖するよう適合された哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）；ヒト胎児腎臓株（例えばGraham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74に記載される293または293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えばMather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252に記載されるTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳腺腫瘍（MM T 060562）；例えばMather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68に記載されるTRI細胞；MRC 5細胞；およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR-CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220）；ならびに骨髓腫細胞株、例えばY0、NS0およびSp2/0を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照のこと。

30

【0147】

一般的なクロマトグラフィー法は、当業者に公知であり、例えばChromatography, 5th edition, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed.); Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Chromatography Today, Poole, D.F., and Poole, S.K., Else

40

50

vier Science Publishing Company, New York, (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; またはCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M., et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい。

【 0 1 4 8 】

上述の段落で用いられた、特許を除く科学引用文献：

Andrew S.M., Titus J.A., 2003, Curr Protoc Cell Biol. Unit 16.4. (Chapter 16).

Mage, E.L.M., 1987, p. 79-97. In: L.B. Schook (Ed.), Monoclonal antibody production techniques and applications, Marcel Dekker Inc., New York. 10

Parham, P., J Immunol. 131 (1983) 2895-2902.

Parham, P., 1986, p. 14.1-14.23. In: D.M. Weir (Ed.), Handbook of Experimental Immunology, 4th Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Porter, R.R., Biochem J. 73 (1959) 119-126.

Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89 (1960) 230-244. 20

Zhao, Y. L., et al., Protein Expr. Purif. 67 (2009) 182-189.

Akita, E.M., and S. Nakai, J. Immunol. Methods 162 (1993) 155-164.

Tischer, W. and V. Kasche, Trends Biotechnol. 17 (1999) 326-335.

Luo, Q., et al., J. Chrom. 776 (2002) 139-147.

von Pawel-Rammingen, U., et al., EMBO J. 21 (2002) 1607-1615. 30

von Pawel-Rammingen, U. and L. Björck, Curr. Opin. Microbiol. 6 (2003) 50-55.

Ishikawa, E. and S. Yoshitake, J. Immunol. Methods 38 (1980) 117-123.

DeSilva, B.S. and G.S. Wilson, G.S., J. Immunol. Methods 188 (1995) 9-19.

Billah, M.M., ET AL., Bioelectrochem. 80 (2010) 49-54.

Persson, H., ET AL., Infect. Immun. 81 (2013) 2236-2241.

【 0 1 4 9 】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示されるものである。本発明の精神から逸脱することなく、示されている手法を改変できることが理解されるべきである。

【実施例】

【 0 1 5 0 】

ベバシズマブは、Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) から入手した。パパインは、Sigma-Aldrich/Roch Diagnostics GmbHから10 mg/mLの濃度の懸濁物として入手 50

した。ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインは、Genovis (Lund, Sweden) から商標名GingisKHANの下で入手した。GingisKHANは、各々の消化の前に、200 μ L 再蒸留水 (ddH₂O) で再構成して2000 U/200 μ Lとし、10x 還元剤は、50 μ L ddH₂Oを用いて新しく調製した (終濃度: 20 mMシステイン)。

【0151】

実施例1

一過的なFabの発現および精製

抗体軽鎖および重鎖Fdフラグメントを遺伝子合成物として準備し、各々の鎖について標準的なクローニング手法を用いて特有の制限部位を通じて別個の発現ベクターにクローニングし、懸濁下で増殖するHEK細胞において分泌発現されるようにした。HEK293-F細胞 (Invitrogen, Cat. No. 510029) へのトランスフェクト (1:1プラスミド比) を、抗体ベクターのMaxiprep (Qiagen, Cat. No. 12163) 調製物、Opti-MEM I培地 (Invitrogen, Cat. No. 31985) 293フェクチン (Invitrogen, Cat. No. 31985070) および無血清FreeStyle 293発現培地 (Invitrogen, Cat. No. 12338081) 中1~2x 10E+06生細胞/mLの初期細胞密度を用いて細胞供給元の指示にしたがい実施した。抗体含有細胞培養上清を、振とうフラスコ中での7日間の培養後に14,000x gで30分間の遠心分離によって収集し、0.22 μ m滅菌フィルター (Thermo Scientific, Cat. No. 566-0020) を通じてろ過した。抗体を上清から直接精製するか、または上清を精製まで-80°Cで保管した。精製されたFabの質を、SEC およびBioAnalyzerによって分析した。

【0152】

実施例2

パパイニンによるベバシズマブの酵素的切断

精製なし:

抗体を、20 mMヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0に希釈して1 mg/mLの終濃度とし、2 μ Lの250 mM L-システイン (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) および10.9 μ Lの希釈パパイニン (20 mMヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0中7.34 U/mL) を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。

【0153】

精製あり:

抗体を、37°Cで170分間、5 mMシステインの存在下でパパイニン (0.8 U/mg mAb; Sigma-Aldrich/Roche) と共にインキュベートした。非切断抗体、FcフラグメントおよびパパイニンからFabを単離するために、混合物を、製造元のプロトコルにしたがいCaptureSelect IgG-CH1およびMabSelectSuRe親和性クロマトグラフィー (GE Healthcare) に適用した。最後に、Superdex 75 10/300 GLカラム (GE Healthcare) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを、140 mM NaCl、20 mMヒスチジン (pH 6.0) を泳動緩衝液として用いて実施した。Fabのタンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づき算出されたモル吸光係数を用いて、280 nmで光学密度 (OD) を測定することによって決定した。純度を、還元剤 (5 mM 1,4-ジチオトレイトール) の存在下および非存在下でのSDS-PAGEならびにクマシーブリリアントブルー染色によって分析した。

【0154】

実施例3

ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインによるベバシズマブの酵素的切断

各消化の前に、GingisKHANを、200 μ L ddH₂Oで再構成して2000 U/200 μ Lとし、10x 還元剤を、50 μ L ddH₂Oを用いて新しく調製した (終濃度: 20 mMシステイン)。100 μ gの抗体を、100 mM Tris、pH 8.0中1 mg/mLの終濃度に希釈し、その後37°Cで1時間、10 μ L GingisKHANおよび11 μ Lの新しく調製した10x 還元剤を用いて消化した。

【0155】

実施例4

UHR-ESI-QTOF質量分析

サンプルを、2%ギ酸を含む40%アセトニトリル (v/v) を用いてSephadex G25カラム (Kronlab、5x250mm、TAC05/250G0-SR) におけるHPLCにより脱塩した。TriVersa NanoMate ソース (Advion) を装着したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) におけるESI-QTOF MSを通じて、総質量を決定した。ヨウ化ナトリウム (Waters ToF G2-Sample Kit 2 Part: 700008892-1) を用いてキャリブレーションを行った。組み換えおよび精製されたFabについては、900~2600 m/z (ISCID: 0.0 eV) でデータ取得を行い、hIgG1または消化されたhIgG1については、900~4000 m/z (ISCID: 0.0 eV) でデータ取得を行った。生の質量スペクトルを評価し、独自開発のRocheソフトウェアツールを用いて個々の相対モル質量に変換した。結果の可視化のために、同じ独自開発ソフトウェアを使用して、デコンボリューション質量スペクトルを生成した。

10

【0156】

実施例5

表面プラズモン共鳴

結合親和性および速度論を、BIAcore T200機器 (GE Healthcare) を用いた表面プラズモン共鳴によって調査した。すべての実験を、泳動および希釈緩衝液としてPBS-T (10 mM Na₂HPO₄、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4) を用いて25°Cで実施した。抗Hisタグ (GE Healthcare、#28995056) または抗ヒトFab抗体 (GE Healthcare、#28958325) を、標準的なアミンカップリング化学を用いてシリーズS CM5チップ (GE Healthcare、#29104988) に固定した。ヒスチジンタグ付加VEGFまたは全長IgG/Fabを、10~50 RUの反応を示すよう表面に捕捉させた。分析物を、2.2 nM~1800 nMの濃度で180秒間かけて、30 μL/分の流速で表面に注入した (結合フェーズ)。解離フェーズを、泳動緩衝液で洗浄することによって、最大3600秒間モニターした。5 μL/分の流速で10 mMグリシンpH 1.5を60秒間注入することによって表面を再生した。バルク屈折率差を、モック表面から得られた反応を差し引くことによっておよびブランク注入を差し引くことによって補正した (二重参照)。得られた曲線を、BIAevaluationソフトウェアを用いて1:1ラングミュア結合モデルにフィットさせた。

20

【0157】

実施例6

VEGF-A特異的レポーター遺伝子アッセイ

ホタルルシフェラーゼの存在下でKDR (KDR = VEGF受容体2) およびNFAT応答エレメントを発現するレポーター遺伝子細胞株GloResponse (商標) NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293を、Promega Corporation, Madison, USAから購入した。VEGF-AがKDRに結合すると、カルシニューリンを通じたシグナル伝達によりNFATが活性化し、核に移動し、NFAT応答エレメントに結合し、その後にルシフェラーゼ遺伝子を発現させる。VEGF121 (10.8 nM 40 μL/ウェル) を、(DMEM、1% FBS、40 μL/ウェルに希釈された) 抗VEGF抗体、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインで消化された該抗体、VEGF-A/第2の無関係な抗原に対する二特異性のCrossMabおよびポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン陰性対照と共に室温で約30分間インキュベートした。1% FBSを補充した40 μL DMEM中のFreeStyle (商標) 293発現培地、100 μg/mLハイグロマイシンB、250 μg/mLジェネティシン (Thermo Fischer Scientific、Sigma Aldrich、Calbiochem) 中で培養された5 x 10⁴個のGloResponse (商標) HEK293細胞 (Promega Coop.) を、懸濁物として添加し、37°C、5% CO₂下で5時間インキュベートした。発光基質 (Promega Coop., ONE-Glo (商標) EX、60 μL/ウェル) を添加する前に、プレートを室温で約15分間平衡化した。内容物を、オービタルシェーカーにおいて600 rpmで約1~3分間、混合した。発光強度を、発光リーダーを用いて測定した。

30

40

【0158】

実施例7

CEACAM5細胞表面結合アッセイ

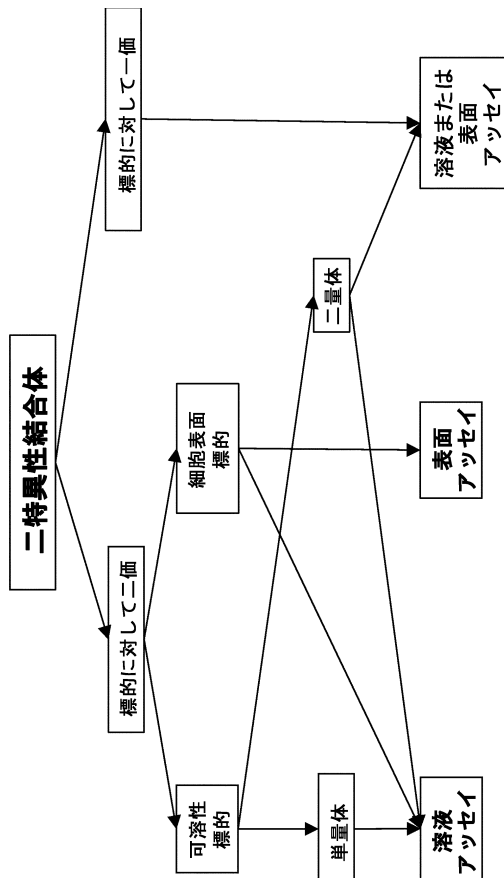
RPMI1640、20% ウシ胎仔血清 (FBS)、1 x GIBCO GlutaMax (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany) 中で培養された1 x 10⁵個の胃腺癌細胞を、PBS、5% FBSを用い

50

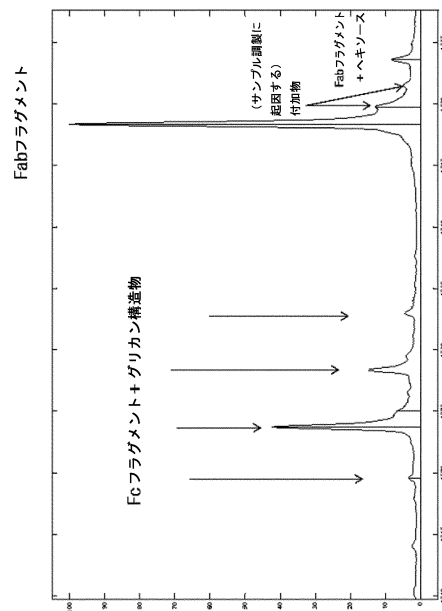
て2回洗浄し、PBS、5% FBSに懸濁させ、抗CEA抗体、該抗CEA抗体のパパイン消化によって得られた精製されたFabフラグメント、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパインで消化された該抗体および陰性対照（無関係の標的に結合する抗体、ポルフィロモナス・ジンジバリスのリジン・ジンジパイン単独）と共に4℃で1時間インキュベートした。結合した抗体/Fabフラグメントを、Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kitを製造元（Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific）の指示にしたがって用いて標識されたマウス抗ヒトカッパ軽鎖抗体（150 $\mu\text{g/mL}$ ）を用いて、検出した。この混合物を、4℃の暗所で30分間インキュベートし、BD FACSCanto IIおよびFACSDivaソフトウェア（BD Biosciences, Heidelberg, Germany）を用いたフローサイトメトリーによって分析した。特異性を、アイソタイプ対照（Alexa Fluor 647標識マウスIgG2a, BD Biosciences）を用いて検証した。生細胞のゲーティングを、サイズおよび粒度に基づき前方および側方散乱を用いて行い、結合した抗体/Fabフラグメントを、蛍光シグナルを測定することによって検出した。

10

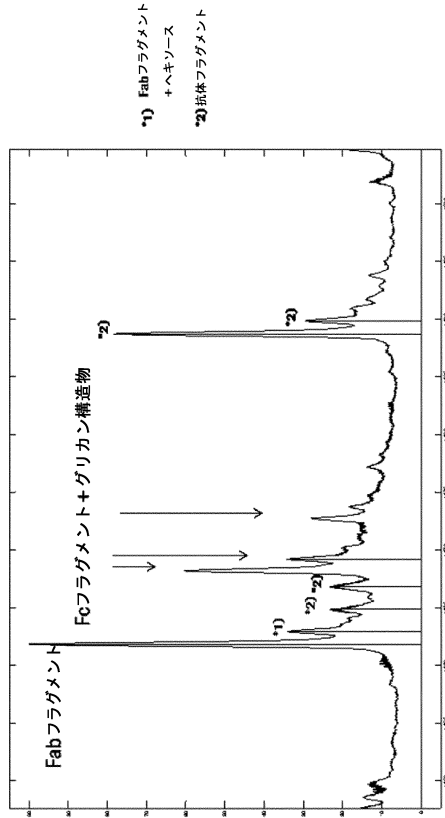
【図 1】



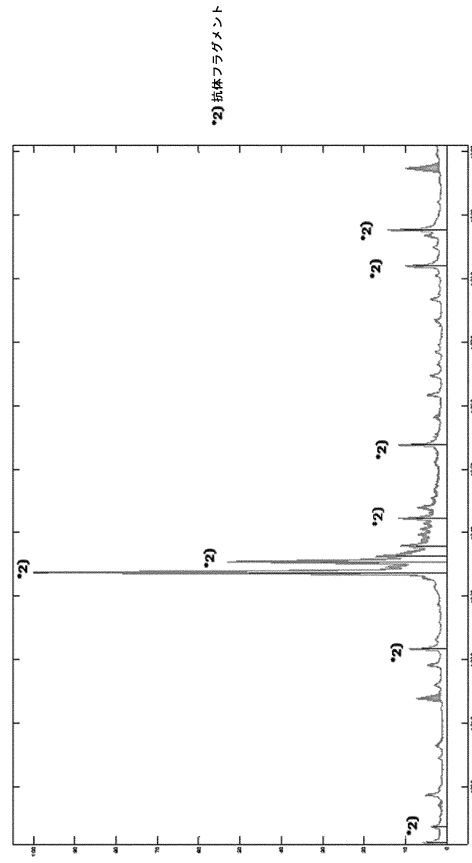
【図 2】



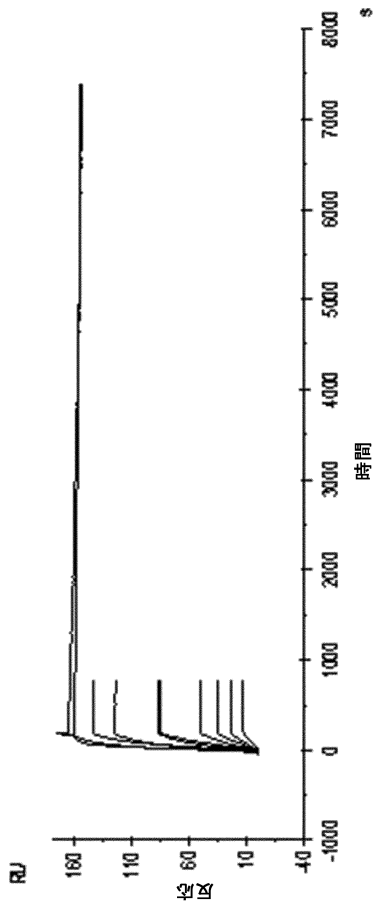
【図 3】



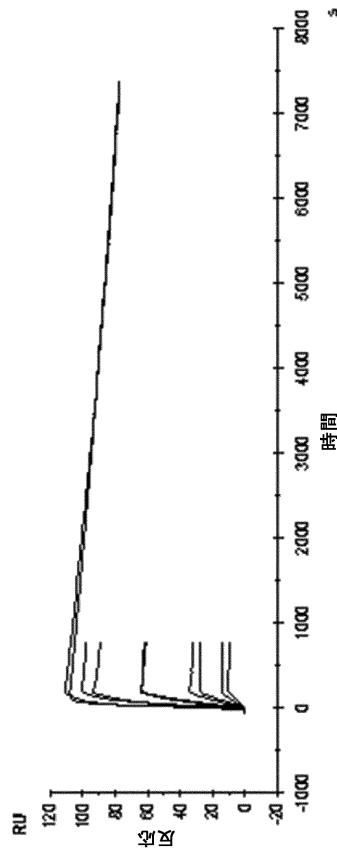
【図 4】



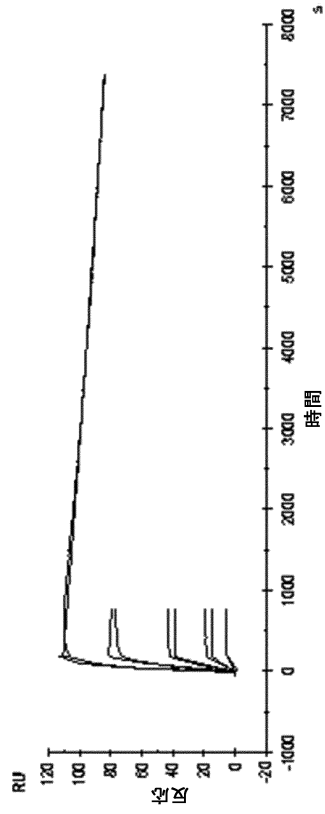
【図 5 - 1】



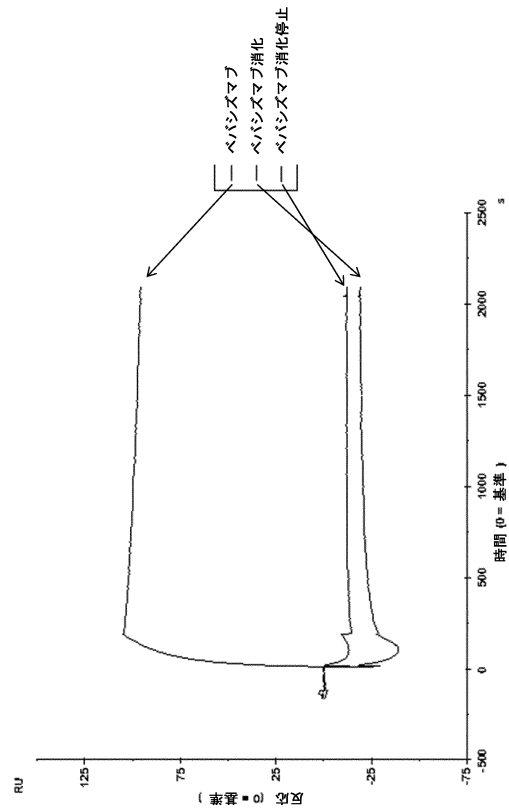
【図 5 - 2】



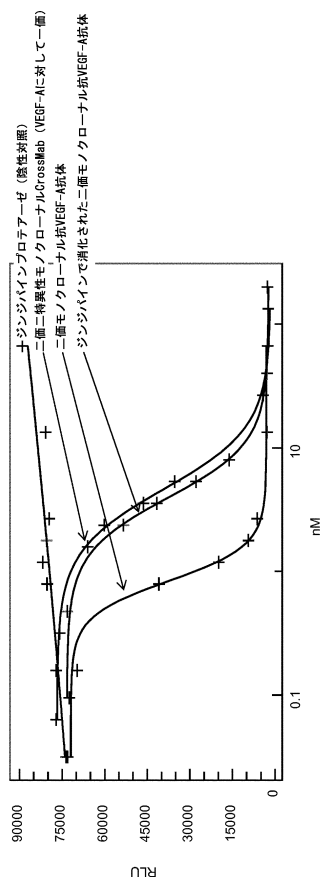
【図 5-3】



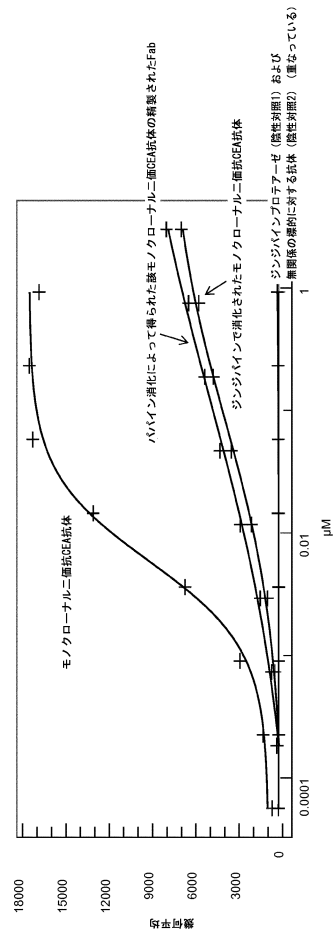
【図 5-4】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006788010000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C O 7 K 16/00 (2006.01) C O 7 K 16/00

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 モエレケン ヨルク
ドイツ連邦共和国 8 0 6 8 6 ミュンヘン オシエツキーシュトラッセ 2

(72)発明者 モルホジ ミヒャエル
ドイツ連邦共和国 8 0 6 8 6 ミュンヘン ファヒナーシュトラッセ 7エー

(72)発明者 ガスナー クリスチャン
ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルグ ハビヒトバーク 4

(72)発明者 エンデスフェルダー マニュエル
ドイツ連邦共和国 8 2 2 3 4 ヴェスリング アム ライゼルト 5

(72)発明者 レグラ ヨルク トーマス
ドイツ連邦共和国 8 1 3 7 7 ミュンヘン インナーコフラーシュトラッセ 17ビー

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 国際公開第2015/073580 (WO, A1)
国際公開第95/011298 (WO, A1)
特表2011-514146 (JP, A)
特表2008-525041 (JP, A)
特開2013-087087 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 0 2
C O 7 K 1 6 / 0 0
C 1 2 N 9 / 5 2