

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-101545

(P2020-101545A)

(43) 公開日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 F	
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 D	

審査請求 未請求 請求項の数 44 O L 外国語出願 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2019-228754 (P2019-228754)	(71) 出願人	507302748
(22) 出願日	令和1年12月19日 (2019.12.19)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(31) 優先権主張番号	62/781,790		・インコーポレイテッド
(32) 優先日	平成30年12月19日 (2018.12.19)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 タリタ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ウン オールド ソー ミル リバー ロ
			ード 777
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			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】 抗体開発のためのC Eーウェスタンの応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】試料中の抗体のバリエーション、混入タンパク質、または複数の抗体を、物理的パラメータによって検出し、それらを識別するための方法を提供する。

【解決手段】キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で試料のタンパク質成分を分子量または電荷によって分離する工程；1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程；1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、試料中の抗体、混入タンパク質、または複数の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と接触させる工程であって、それによって試料中のバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する、工程を含む。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の抗体のバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別するための方法：

関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で分子量または電荷によって分離する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、該関心対象の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および

該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって、該試料中の該関心対象の抗体のサイズバリエーションまたは電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する、工程。

10

**【請求項 2】**

前記1つまたは複数の一次抗体が、前記関心対象の抗体の重鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

前記1つまたは複数の一次抗体が、前記関心対象の抗体の軽鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む、請求項1または請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

前記1つまたは複数の一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、

該1つまたは複数の一次抗体を、該1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および

該検出可能なラベルを検出することを含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

30

**【請求項 6】**

試料の前記タンパク質成分が電荷によって分離され、前記方法が、前記関心対象の抗体の電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

30

**【請求項 7】**

試料の前記タンパク質成分が分子量によって分離され、前記方法が、前記関心対象の抗体のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 8】**

前記試料が、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

40

**【請求項 9】**

前記1つまたは複数の追加の関心対象の抗体が検出される、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

試料中の前記抗体のバリエーションの相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 11】**

前記関心対象の抗体が二重特異性抗体を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 12】**

前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む

50

、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

前記試料が内部標準を含む、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

前記分離マトリックスが両性担体を含む、請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記分離マトリックスが、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む、請求項15記載の方法。

【請求項18】

以下の工程を含む、抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出するための方法：

試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で物理的パラメータによって分離する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象のタンパク質混入物に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および

該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出する、工程。

【請求項19】

抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物のバリエーションを前記物理的パラメータによって識別する工程をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、請求項18または請求項19記載の方法。

【請求項21】

前記分離マトリックスが両性担体を含む、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記物理的パラメータが電荷を含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記分離マトリックスが、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む、請求項20記載の方法。

【請求項24】

前記物理的パラメータが分子量を含む、請求項23記載の方法。

【請求項25】

前記1つまたは複数の一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、請求項18～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

前記1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、

該1つまたは複数の一次抗体を、該1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および

該検出可能なラベルを検出すること

を含む、請求項18～24のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 27】**

前記関心対象のタンパク質混入物の電荷バリエーションまたはサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する工程をさらに含む、請求項18～26のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 28】**

前記関心対象のタンパク質混入物の相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、請求項18～27のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 29】**

前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む、請求項18～28のいずれか一項記載の方法。

10

**【請求項 30】**

前記試料が内部標準を含む、請求項18～29のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 31】**

前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、請求項18～30のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 32】**

前記1つまたは複数の一次抗体がポリクローナル抗体を含む、請求項18～31のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 33】**

前記関心対象のタンパク質混入物がPLBD2を含む、請求項18～32のいずれか一項記載の方法。

20

**【請求項 34】**

以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の2つ以上の抗体の混合物中の抗体を検出しかつ/またはそれらを識別するための方法：

2つ以上の関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で電荷によって分離する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象の第1の抗体に特異的に結合する第1の一次抗体と、接触させる工程；

該第1の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第1の抗体を検出する、工程；

30

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象の第2の抗体に特異的に結合する第2の一次抗体と、接触させる工程；および

該第2の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第2の抗体を検出し、かつ試料中の該抗体を識別する、工程。

**【請求項 35】**

前記1つまたは複数のキャピラリー内の前記タンパク質成分を、関心対象の第3の抗体に特異的に結合する第3の一次抗体と、接触させる工程；

該第3の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第3の抗体を検出する、工程

40

をさらに含む、請求項34記載の方法。

**【請求項 36】**

前記1つまたは複数のキャピラリー内の前記タンパク質成分を、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の追加の一次抗体と、接触させる工程；

該1つまたは複数の追加の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該追加の関心対象の抗体を検出する、工程

をさらに含む、請求項35記載の方法。

**【請求項 37】**

前記一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、前記一次抗体の結合を検出する

50

工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

前記一次抗体の結合を検出する工程が、  
該一次抗体を、該一次抗体に特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および  
該検出可能なラベルを検出すること  
を含む、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

前記関心対象の抗体のうちの1つまたは複数の相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、請求項34～38のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項40】

前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む、請求項34～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

前記試料が内部標準を含む、請求項34～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、請求項34～40のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項44】

前記分離マトリックスが両性担体を含む、請求項43記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はバイオ医薬品に関係し、複雑な混合物中のバイオ医薬品および混入物を検出するためのキャピラリー電気泳動の使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

モノクローナル抗体（mAb）は、バイオ治療薬の重要な1クラスであり、数多くの重篤な疾患および慢性疾患の処置において顕著な成功を収めている。しかしmAbは、サイズバリエーションおよび電荷バリエーション、異なるグリコシル化パターンを含むさまざまな翻訳後修飾、ならびにN末端およびC末端の不均一性を伴う、高度に複雑な生物高分子でもある。それゆえに、個々のモノクローナル抗体はそれぞれ、開発中も、最終製品の製造中も、これらの製品の評価に際して考慮する必要があるユニークなプロファイル、特質を呈しうる。

【0003】

mAbにおける重要品質特性（critical quality attributes：CQA）のモニタリングおよび評価は、製薬業界における規制要件である。mAb生産中は、潜在的混入タンパク質の存在も考慮しなければならない。加えて、併用療法の使用（例えば製剤カクテルにおける複数のmAbの使用）が増加するにつれて、これらのカクテル中の個々のmAbをモニタリングできることも、ますます重要になるだろう。

40

【0004】

電気泳動は、電場における移動速度の相違に基づいて分子の混合物を分離するために使用されてきた。一般に電気泳動とは、流体またはゲルと接触している1つまたは複数の電極または導電性部材に印加された起電力の作用下での、その流体またはゲルにおける懸濁分子または溶解分子の運動を指す。電気泳動分離の公知のモードには、緩衝溶液中での分子の移動度の相違（一般にゾーン電気泳動と呼ばれる）、ゲルまたはポリマー溶液中での分子の移動度の相違（一般にゲル電気泳動と呼ばれる）、または水素（pH）勾配のポテン

50

シャルにおける分子の移動度の相違（一般に等電点電気泳動と呼ばれる）に基づいて分子を分離するものが含まれる。生体分子の純度および電荷不均一性を調べるためにキャピラリー電気泳動技法は有効であり、産業上広く使用されているが、キャピラリー電気泳動は、さまざまな分子種の選択的検出を可能にするものではなく、目的物質と製造工程不純物との弁別を可能にするものでもない。したがって、mAbの調製物および製剤をモニタリングする追加の方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

一局面において、本発明は、以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の抗体のバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別するための方法を提供する：関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で分子量または電荷によって分離する工程；1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程；1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象のタンパク質、例えば抗体、またはその一部に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって、試料中の関心対象の抗体のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する、工程。

10

【0006】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体の重鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む。

20

【0007】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体の軽鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む。

【0008】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体は、検出可能なラベルで標識されており、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、検出可能なラベルを検出することを含む。

【0009】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、1つまたは複数の一次抗体を、1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体であって検出可能なラベルを有する二次抗体と、接触させること；および検出可能なラベルを検出することを含む。

30

【0010】

本方法のさまざまな態様において、試料のタンパク質成分は電荷によって分離され、本方法は、関心対象の抗体の電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。

【0011】

本方法のさまざまな態様において、試料のタンパク質成分は分子量によって分離され、本方法は、関心対象の抗体のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。

40

【0012】

本方法のさまざまな態様において、試料は、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体を含む。

【0013】

本方法のさまざまな態様では、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体が検出される。

【0014】

いくつかの態様において、本方法は、試料中の抗体のバリエーションの相対量または絶対量を決定する工程を、さらに含む。

【0015】

本方法のさまざまな態様において、関心対象の抗体は二重特異性抗体を含む。

50

## 【0016】

本方法のさまざまな態様において、検出可能なラベルは、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む。

## 【0017】

本方法のさまざまな態様において、試料は内部標準を含む。

## 【0018】

本方法のさまざまな態様において、固定化は、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む。

## 【0019】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数のキャピラリーは分離マトリックスを含む。

10

## 【0020】

本方法のさまざまな態様において、分離マトリックスは両性担体 (carrier ampholyte) を含む。

## 【0021】

本方法のさまざまな態様において、分離マトリックスは、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む。

## 【0022】

一局面において、本発明は、以下の工程を含む、抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出するための方法を提供する：キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で試料のタンパク質成分を物理的パラメータによって分離する工程；1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程；1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象のタンパク質混入物に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出する、工程。

20

## 【0023】

いくつかの態様において、本方法は、抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物のバリエーションを物理的パラメータによって識別する工程を、さらに含む。

## 【0024】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数のキャピラリーは分離マトリックスを含む。

30

## 【0025】

本方法のさまざまな態様において、分離マトリックスは両性担体を含む。

## 【0026】

本方法のさまざまな態様において、物理的パラメータは電荷を含む。

## 【0027】

本方法のさまざまな態様において、分離マトリックスは、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む。

## 【0028】

本方法のさまざまな態様において、物理的パラメータは分子量を含む。

40

## 【0029】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体は、検出可能なラベルで標識されており、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、検出可能なラベルを検出することを含む。

## 【0030】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、1つまたは複数の一次抗体を、1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体であって検出可能なラベルを有する二次抗体と、接触させる工程；および検出可能なラベルを検出する工程を、さらに含む。

50

## 【0031】

いくつかの態様において、本方法は、関心対象のタンパク質混入物の電荷バリエーションまたはサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する工程を、さらに含む。

## 【0032】

いくつかの態様において、本方法は、関心対象のタンパク質混入物の相対量または絶対量を決定する工程を、さらに含む。

## 【0033】

本方法のさまざまな態様において、検出可能なラベルは、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む。

## 【0034】

本方法のさまざまな態様において、試料は内部標準を含む。

## 【0035】

本方法のさまざまな態様において、固定化は、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む。

## 【0036】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数の一次抗体はポリクローナル抗体を含む。

## 【0037】

本方法のさまざまな態様において、関心対象のタンパク質混入物はPLBD2を含む。

## 【0038】

別の局面において、本発明は、以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の2つ以上の抗体の混合物中の抗体を検出しかつ/またはそれらを識別するための方法を提供する：キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で2つ以上の関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を電荷によって分離する工程；1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程；1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第1の抗体に特異的に結合する第1の一次抗体と、接触させる工程；第1の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第1の抗体を検出する、工程；1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第2の抗体に特異的に結合する第2の一次抗体と、接触させる工程；および第2の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第2の抗体を検出し、かつ試料中の抗体を識別する、工程。

## 【0039】

いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第3の抗体に特異的に結合する第3の一次抗体と、接触させる工程；第3の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第3の抗体を検出する、工程を、さらに含む。

## 【0040】

いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の追加の一次抗体と、接触させる工程；および1つまたは複数の追加の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって追加の関心対象の抗体を検出する工程を、さらに含む。

## 【0041】

本方法のさまざまな態様において、一次抗体は、検出可能なラベルで標識されており、一次抗体の結合を検出する工程は、検出可能なラベルを検出することを含む。

## 【0042】

本方法のさまざまな態様において、一次抗体の結合を検出する工程は、一次抗体を、一次抗体に特異的に結合する二次抗体であって検出可能なラベルを有する二次抗体と、接触させること；および検出可能なラベルを検出することを含む。

## 【0043】

いくつかの態様において、本方法は、混合物中の関心対象の抗体の相対量または絶対量

10

20

30

40

50



を決定する工程を、さらに含む。

【0044】

本方法のさまざまな態様において、検出可能なラベルは、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む。

【0045】

本方法のさまざまな態様において、試料は内部標準を含む。

【0046】

本方法のさまざまな態様において、固定化は、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む。

【0047】

本方法のさまざまな態様において、1つまたは複数のキャピラリーは分離マトリックスを含む。

【0048】

本方法のさまざまな態様において、分離マトリックスは両性担体を含む。

【0049】

さまざまな態様において、上述のまたは本明細書において論じる態様の特徴または構成要素はどれでも組み合わせることができ、そのような組み合わせは本開示の範囲に包含される。上述のまたは本明細書において論じる具体的な値はいずれも、上述のまたは本明細書において論じる別の関連する値と組み合わせ、それらの値が範囲の上端と下端を表している範囲を具陳することができ、そのような範囲は本開示の範囲に包含される。

【0050】

より具体的には、本発明は以下を提供する：

[1] 以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の抗体のバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別するための方法：

関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で分子量または電荷によって分離する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、該関心対象の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および

該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって、該試料中の該関心対象の抗体のサイズバリエーションまたは電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する、工程；

[2] 前記1つまたは複数の一次抗体が、前記関心対象の抗体の重鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む、[1]の方法；

[3] 前記1つまたは複数の一次抗体が、前記関心対象の抗体の軽鎖に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む、[1]または[2]の方法；

[4] 前記1つまたは複数の一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、[1]～[3]のいずれかの方法；

[5] 前記1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、

該1つまたは複数の一次抗体を、該1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および

該検出可能なラベルを検出することを含む、[1]～[3]のいずれかの方法；

[6] 試料の前記タンパク質成分が電荷によって分離され、前記方法が、前記関心対象の抗体の電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である、[1]～[5]のいずれかの方法；

[7] 試料の前記タンパク質成分が分子量によって分離され、前記方法が、前記関心対象の抗体のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である、[1]～[5]の

10

20

30

40

50

いずれかの方法；

[8] 前記試料が、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体を含む、[1]～[7]のいずれかの方法；

[9] 前記1つまたは複数の追加の関心対象の抗体が検出される、[8]の方法；

[10] 試料中の前記抗体のバリエーションの相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、[1]～[9]のいずれかの方法；

[11] 前記関心対象の抗体が二重特異性抗体を含む、[1]～[10]のいずれかの方法；

[12] 前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む、[1]～[11]のいずれかの方法；

[13] 前記試料が内部標準を含む、[1]～[12]のいずれかの方法；

10

[14] 前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、[1]～[13]のいずれかの方法；

[15] 前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、[1]～[14]のいずれかの方法；

[16] 前記分離マトリックスが両性担体を含む、[15]の方法；

[17] 前記分離マトリックスが、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む、[15]の方法；

[18] 以下の工程を含む、抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出するための方法；

試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で物理的パラメータによって分離する工程；

20

該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；

該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象のタンパク質混入物に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と、接触させる工程；および

該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出する、工程；

[19] 抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物のバリエーションを前記物理的パラメータによって識別する工程をさらに含む、[18]の方法；

[20] 前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、[18]または[19]の方法；

30

[21] 前記分離マトリックスが両性担体を含む、[20]の方法；

[22] 前記物理的パラメータが電荷を含む、[21]の方法；

[23] 前記分離マトリックスが、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む、[20]の方法；

[24] 前記物理的パラメータが分子量を含む、[23]の方法；

[25] 前記1つまたは複数の一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、該1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、[18]～[24]のいずれかの方法；

[26] 前記1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程が、

40

該1つまたは複数の一次抗体を、該1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および

該検出可能なラベルを検出すること

を含む、[18]～[24]のいずれかの方法；

[27] 前記関心対象のタンパク質混入物の電荷バリエーションまたはサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する工程をさらに含む、[18]～[26]のいずれかの方法；

[28] 前記関心対象のタンパク質混入物の相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、[18]～[27]のいずれかの方法；

[29] 前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む、[18]～[28]のいずれかの方法；

50

- [30] 前記試料が内部標準を含む、[18]～[29]のいずれかの方法；
- [31] 前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、[18]～[30]のいずれかの方法；
- [32] 前記1つまたは複数の一次抗体がポリクローナル抗体を含む、[18]～[31]のいずれかの方法；
- [33] 前記関心対象のタンパク質混入物がPLBD2を含む、[18]～[32]のいずれかの方法；
- [34] 以下の工程を含む、物理的パラメータによって試料中の2つ以上の抗体の混合物中の抗体を検出しかつ/またはそれらを識別するための方法；
- 2つ以上の関心対象の抗体を含む試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で電荷によって分離する工程；
- 該1つまたは複数のキャピラリー内で該試料のタンパク質成分を固定化する工程；
- 該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象の第1の抗体に特異的に結合する第1の一次抗体と、接触させる工程；
- 該第1の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第1の抗体を検出する、工程；
- 該1つまたは複数のキャピラリー内の該タンパク質成分を、関心対象の第2の抗体に特異的に結合する第2の一次抗体と、接触させる工程；および
- 該第2の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第2の抗体を検出し、かつ試料中の該抗体を識別する、工程；
- [35] 前記1つまたは複数のキャピラリー内の前記タンパク質成分を、関心対象の第3の抗体に特異的に結合する第3の一次抗体と、接触させる工程；
- 該第3の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該関心対象の第3の抗体を検出する、工程
- をさらに含む、[34]の方法；
- [36] 前記1つまたは複数のキャピラリー内の前記タンパク質成分を、1つまたは複数の追加の関心対象の抗体に特異的に結合する1つまたは複数の追加の一次抗体と、接触させる工程；
- 該1つまたは複数の追加の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって該追加の関心対象の抗体を検出する、工程
- をさらに含む、[35]の方法；
- [37] 前記一次抗体が、検出可能なラベルで標識されており、前記一次抗体の結合を検出する工程が、該検出可能なラベルを検出することを含む、[34]～[36]のいずれかの方法；
- [38] 前記一次抗体の結合を検出する工程が、
- 該一次抗体を、該一次抗体に特異的に結合する二次抗体と接触させることであって、該二次抗体が検出可能なラベルを有する、接触させること；および
- 該検出可能なラベルを検出すること
- を含む、[34]～[36]のいずれかの方法；
- [39] 前記関心対象の抗体のうちの1つまたは複数の相対量または絶対量を決定する工程をさらに含む、[34]～[38]のいずれかの方法；
- [40] 前記検出可能なラベルが、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む、[34]～[39]のいずれかの方法；
- [41] 前記試料が内部標準を含む、[34]～[40]のいずれかの方法；
- [42] 前記固定化が、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む、[1]～[13]のいずれかの方法；
- [43] 前記1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む、[34]～[40]のいずれかの方法；
- [44] 前記分離マトリックスが両性担体を含む、[43]の方法。

【図面の簡単な説明】

【0051】

本特許ファイルまたは本出願ファイルは、カラーで作成された図面を少なくとも1つ含

10

20

30

40

50

有する。カラー図面を含むこの特許または特許出願公報の写しは、請求に応じて、必要な手数料が支払われた場合に、米国特許商標庁より提供される。

【0052】

【図1】図1は、キャピラリー電気泳動によってタンパク質をおおよそその分子量で分離し検出するための例示的ワークフローの図である。

【図2】図2Aは、抗カッパ抗体および抗FC抗体を用いたCE-ウェスタンによる抗体断片の分析を示す、グラフ化された一組のトレースである。この結果は、サイズベースのCE-ウェスタンがmAb試料中のサイズバリエーションを高感度に定量できることを実証している。図2Bは、総タンパク質分析を用いたCE-ウェスタンによる抗体断片の分析を示すグラフである。この結果は、サイズベースのCE-ウェスタン分析がmAb試料中のサイズバリエーションを高感度に定量できることを実証している。 10

【図3】図3Aは、図2Aに示す抗体断片の相対量の棒グラフである。図3Bは、図2Bに示す抗体断片の相対量の棒グラフである。

【図4】図4は、サイズベースのCE-ウェスタンを用いた抗体断片の分析がCE-SDSを用いた抗体断片の分析と同等であることを実証する2つのグラフを示している。

【図5】図5Aは、例示的mAb2プロセスプールが、組換えPLBD2の場合と非常によく似たPLBD2種を有することを示す非還元条件下での分析のグラフである。図5Bは、例示的mAb2プロセスプールが、組換えPLBD2の場合と非常によく似たPLBD2種を有することを示す還元条件下での分析のグラフである。

【図6】図6は、還元条件下および非還元条件下でのPLBD2の濃度依存的分析を実証する一組のグラフを示している。この結果は、サイズベースのCE-ウェスタンによる抗体調製物試料中のPLBD2の定量がELISA測定と同等であることを示している。 20

【図7】図7は、キャピラリー電気泳動によってタンパク質を電荷で分離し検出するための例示的ワークフローの図である。

【図8】図8は、抗体調製物に関してイメージCIEF (imaged CIEF) (iCIEF) とCE-ウェスタンの結果が同等であることを示している。iCIEFでもiCIEF-ウェスタンでも、同等な電荷バリエーションプロファイルが得られた。この結果は、抗体の分析に関して、iCIEF-ウェスタンがiCIEFの実行可能な代替法であることを実証している。

【図9】図9Aは、電荷ベースのCE-ウェスタン (iCIEF-ウェスタン) が、個々の抗体に対する二次抗体を用いて試料中の個々の抗体種の相対濃度を決定できることを示すグラフである。図9Bは、図9Aのグラフと同様であるが、個々の抗体種を示すために、合成曲線が取り除かれている。 30

【図10】図10は、iCIEFを用いた三成分抗体混合薬の分析を図解する一組のグラフを示しており、個々の抗体電荷バリエーションのpI範囲はオーバーラップしていることがわかる。この結果は、pIがオーバーラップしている可能性がある複雑な抗体調製物の分析には、iCIEFは能力不足であることを実証している。

【図11】図11は、電荷ベースのCE-ウェスタン (iCIEF-ウェスタン) を使用し、カクテル中の個々の抗体に対する二次抗体を使用し用いて分析された、図10の三成分抗体混合薬の個々の分子種の分析に関する一組のグラフおよび表を示している。3つの抗体電荷バリエーションをキャピラリーの検出ウィンドウ内に移動させるためにTEMED (0.25%) を加えた。この結果は、複雑な抗体カクテルを分析するためにiCIEF-ウェスタンを使用できることを実証している。 40

【図12】図12は、iCIEF-ウェスタンには、複合製剤中の個々の抗体を選択的に検出する能力があることを示す、合成グラフである。

【図13】図13は、mAb4の定量分析が、iCIEFおよびiCIEF-ウェスタンを用いて単体で評価した場合と、iCIEF-ウェスタンを用いて混合物として評価した場合とで類似していることを実証する、グラフおよび表を示している。

【発明を実施するための形態】

【0053】

発明の詳細な説明

以下に本発明を説明するが、その前にまず、本発明は、記載する特定の方法および実験条件に限定されないことを理解すべきである。そのような方法および条件はさまざまであることができるからである。また、本明細書において使用する用語には、特定の態様を説明する目的しかなく、限定を意図していないことも理解すべきである。本発明の範囲を限定するのは、本願の請求項だけだからである。任意の態様または態様の特徴は互いに組み合わせることができ、そのような組み合わせは明らかに本発明の範囲に包含される。

#### 【0054】

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書において使用される「約」という用語は、それが具陳された特定の数値に関して使用される場合には、その値が、具陳された値から1%以下までは変動しうることを意味する。例えば、本明細書において使用される「約100」という表現は、99および101ならびにそれらの間のすべての値（例えば99.1、99.2、99.3、99.4など）を包含する。

10

#### 【0055】

本発明の実施または試験では、本明細書に記載するものと類似するか等価な任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法および材料を以下に説明する。本明細書において言及する特許、特許出願および非特許刊行物はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

#### 【0056】

本明細書において使用される略語

20

mAb：モノクローナル抗体

biAb：二重特異性抗体

CQA：重要品質特性

CE：キャピラリー電気泳動

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

iCIEF：イメージCIEF（imaged CIEF）

iCIEF-ウェスタン；電荷ベースのCE-ウェスタン

IEC：イオン交換クロマトグラフィー

QC：品質管理

HRP：セイヨウワサビペルオキシダーゼ

30

HCP：宿主細胞タンパク質

#### 【0057】

定義

本明細書において使用する「抗体」という用語は、4本のポリペプチド鎖、すなわちジスルフィド結合で相互につながれた2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖とで構成される免疫グロブリン分子（すなわち「完全抗体分子」）、ならびにその多量体（例えばIgM）またはそれらの抗原結合断片を指すものとする。各重鎖は、重鎖可変領域（「HCVR」または「V<sub>H</sub>」）と重鎖定常領域（ドメインC<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3で構成される）とで構成される。さまざまな態様において、重鎖はIgGアイソタイプでありうる。場合により、重鎖はIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4から選択される。いくつかの態様において、重鎖は、アイソタイプIgG1またはIgG4であり、任意で、アイソタイプIgG1/IgG2またはIgG4/IgG2のキメラヒンジ領域を含む。各軽鎖は軽鎖可変領域（「LCVR」または「V<sub>L</sub>」）と軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）とで構成される。V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる保存度の高い領域が間に挿入された相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に、さらに細分することができる。各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序で配置された3つのCDRと4つのFRとから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「抗体」という用語は、任意のアイソタイプまたはサブクラスのグリコシル化免疫グロブリンと非グリコシル化免疫グロブリンの両方への言及を包含する。「抗体」という用語は、抗体を発現するようにトランスフェクトされた宿主細胞から単離された抗体など、組換え手段によって調製され、発現され、作出されまたは単離された抗体分子を包含する

40

50

。抗体構造に関する総説として、Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27 (1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003)、およびM. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2 (1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983)を参照されたい。

【0058】

抗体という用語は「二重特異性抗体」も包含し、これには、2つ以上の異なるエピトープに結合することができるヘテロ四量体免疫グロブリンが含まれる。二重特異性抗体の半分は1本の重鎖および1本の軽鎖ならびに6つのCDRを含んでいて、1つの抗原またはエピトープに結合し、残りの半分は異なる抗原またはエピトープに結合する。場合により、二重特異性抗体は、同じ抗原ではあるが異なるエピトープまたはオーバーラップしていないエピトープに結合することができる。場合により、二重特異性抗体は、二重特異性を保ったまま、どちらの半分も同一軽鎖を有する。二重特異性抗体は米国特許出願公開第2010/0331527 (2010年12月30日)に概説されている。

【0059】

抗体の「抗原結合部分」(または「抗原結合断片」)という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する1つまたは複数の断片を指す。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片、(ii) ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片、(iii) VHドメインとCH1ドメインとからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLドメインとVHドメインとからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546)、(vi) 単離されたCDR、および(vii) 合成リンカーによって接続されて1本のタンパク質鎖を形成しているFv断片の2つのドメインVLおよびVHからなり、VL領域とVH領域とがペアリングして一価分子を形成している、scFvが挙げられる。一本鎖抗体の他の形態、例えばダイアボディモ、「抗体」という用語に包含される(例えばHolliger et al. (1993) 90 *PNAS U.S.A.* 6444-6448およびPoljak et al. (1994) 2 *Structure* 1121-1123参照)。

【0060】

さらにまた、抗体およびその抗原結合断片は、当技術分野において一般に公知である標準的な組換えDNA技法を用いて得ることができる(Sambrook et al., 1989参照)。

【0061】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列から誘導される可変領域と定常領域とを有する抗体を包含するものとする。本発明のヒトmAbは、例えばCDRに、特にCDR3に、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダム変異導入もしくは部位特異的変異導入またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異)を含みうる。ただし、本明細書において使用する「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種(例えばマウス)の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトFR配列上に移植されているmAbを包含するものではない。この用語は、非ヒト哺乳動物または非ヒト哺乳動物の細胞において組換え生産された抗体を包含するものではない。

【0062】

本明細書において使用する「試料」という用語は、分子の混合物であって、例えば分離、分析、抽出、濃縮またはプロファイリングなどといった本発明の方法による操作に供される関心対象のポリペプチド、例えばモノクローナル抗体または二重特異性抗体を、少なくとも1つは含んでいるものを指す。

【0063】

本明細書において使用する「分析」または「分析する」という用語は相互可換的に使用され、関心対象の分子(例えば抗体などのポリペプチド)および抗体調製物中の混入物を分離、検出、単離、精製、可溶化、検出および/または特性解析するさまざまな方法のいずれかを指す。

10

20

30

40

50

## 【0064】

本明細書にいう「クロマトグラフィー」とは、混合物、例えばペプチド、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはモノクローナル抗体などの抗体を含有する混合物を、分離するプロセスを指す。クロマトグラフィーでは混合物が固定相を通過することで、関心対象の分子が混合物中の他の分子から分離され、1つまたは複数の関心対象の分子を単離することが可能になる。本明細書に開示する方法において、クロマトグラフィーとは、サイズベースのキャピラリー電気泳動と、等電点電気泳動、すなわち電荷ベースのキャピラリー電気泳動を含む、キャピラリー電気泳動を指す。

## 【0065】

本明細書にいう「接触」には、溶解しているまたは固相にある少なくとも2つの物質を引き合わせること、例えば試料を抗体（例えば、治療用抗体または治療用抗体候補などの関心対象の分子に特異的に結合する抗体）と接触させること、が含まれる。

## 【0066】

本明細書において使用する「単離された」という用語は、生物学的成分（抗体など、例えばモノクローナル抗体）であって、当該成分が天然に見いだされる生物の細胞中の、または当該成分がトランスジェニックに発現される生物の細胞中の、他の生物学的成分（すなわち、他の染色体DNAおよび染色体外DNA、ならびにRNA、タンパク質、脂質、および代謝産物）から、実質的に分離され、それらとは別に生産され、またはそれらから精製されたものを指す。したがって「単離された」核酸、ペプチド、タンパク質、脂質および代謝産物としては、標準的なまたは非標準的な精製方法によって精製された核酸、ペプチド、タンパク質、脂質および代謝産物が挙げられる。この用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸、ペプチド、タンパク質、脂質および代謝産物、ならびに化学的に合成されたペプチド、脂質、代謝産物および核酸も包含する。

## 【0067】

「ペプチド」、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、相互可換的に、ペプチド結合またはペプチド結合ミメティックによって結合されたアミノ酸および/またはアミノ酸類似体のポリマーを指す。20種の天然アミノ酸ならびにそれらの一文字記号および三文字記号は次のとおりである：アラニンA Ala；システインC Cys；アスパラギン酸D Asp；グルタミン酸E Glu；フェニルアラニンF Phe；グリシンG Gly；ヒスチジンH His；イソロイシンI Ile；リジンK Lys；ロイシンL Leu；メチオニンM Met；アスパラギンN Asn；プロリンP Pro；グルタミンQ Gln；アルギニンR Arg；セリンS Ser；スレオニンT Thr；バリンV Val；トリプトファンW Trp；およびチロシンY Tyr。一態様において、ペプチドは、抗体またはその断片もしくは一部、例えば上に列挙した断片または抗体鎖のいずれかである。いくつかの態様において、ペプチドは翻訳後修飾されていてもよい。

## 【0068】

「検出する」および「検出」は、それぞれの標準的な意味を有し、関心対象のタンパク質の、例えばmAbまたは混入物タンパク質の、有無を含む検出、測定および/または特性解析を包含するものとする。

## 【0069】

本明細書において使用する「関心対象のタンパク質」および/または「関心対象の標的タンパク質」という用語は、本明細書において提供する方法を用いて分離されかつ/または検出される任意のタンパク質を指す。好適な関心対象のタンパク質として、抗体、例えばモノクローナル抗体、および他のタンパク質、例えば抗体調製物中の混入タンパク質が挙げられる。

## 【0070】

本明細書において使用する「標準」および/または「内部標準」という用語は、試料に添加することができる、既知量のおよび/または実体（identity）が既知の（例えば分子量、電気泳動移動度プロファイルが既知の）、よく特徴づけられた物質を指し、標準と試料中の分子はどちらも、分子量または等電点に基づいて、電気泳動によって分離される。そうすれば、標準の比較は、分析物の量、例えば試料中に存在するmAbまたは混入物タン

10

20

30

40

50

パク質の量の、定量的または半定量的尺度を与える。

【0071】

概要

モノクローナル抗体 (mAb) バリエーションの特性解析は、それらが治療用抗体候補の安全性、力価および安定性に及ぼす潜在的影響を特定するために、重要である。例えば、規制当局による承認を考慮するには、分子の広範な特性解析を行わなければならない。抗体の混合物を含む製剤では、各抗体の絶対量または相対量の特性解析が決定されなければならない。凝集物および断片は免疫原性および力価に潜在的影響を及ぼしうるので、それらのレベルは、通例、ロット出荷試験、安定性試験および特性解析時にモニタリングされる。さらにまた、当該分子ならびに目的物質由来不純物およびバリエーションの主要分解経路も決定される。UV検出とカップリングされたイオン交換クロマトグラフィー (IEC) は、日常的品質管理 (QC) において mAb バリエーションを分離し定量するために、しばしば使用される。しかし、IEC 分離がもたらすクロマトグラフィーピークの特性解析は、極めて時間のかかるプロセスである。したがって、治療用 mAb 候補の特性解析および mAb 調製物の潜在的混入物の特性解析を行うために、追加の方法が必要とされている。本明細書に開示する方法はこれらのニーズを満たす。

【0072】

本明細書では、モノクローナル抗体 (mAb) の分子量または等電点などといった物理的パラメータによって試料中の mAb のバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法が開示される。開示する方法は抗体調製物の QC 評価において使用することができる。本方法の態様では、関心対象の mAb を含む試料が、キャピラリー電気泳動を用いて、例えば CE システムの 1 つまたは複数のキャピラリー上で、分離 (resolve) または分離 (separate) される。一定の態様において、試料は、分子量によって分離 (resolve) または分離 (separate) される。分子量による分離 (resolve) では、例えば完全に形成された mAb だけでなく、ペアリングしていない重鎖または軽鎖など、どんな抗体断片または分子種が試料中に存在するかを決定することができる (その例を図 2A および図 2B に示す)。一定の態様において、試料は、電荷によって、例えば等電点電気泳動によって、分離 (resolve) または分離 (separate) される。電荷による mAb の分離には、mAb の均一性を、例えば分子量による分離では容易にはわからない mAb の表面電荷の変化を、決定することができるという追加の利点がある。一定の態様において、試料は単一のキャピラリー内で分離 (resolve) または分離 (separate) される。一定の態様において、試料は複数のキャピラリー内で、例えば並行して、分離 (resolve) または分離 (separate) される。1 つまたは複数のキャピラリー中でタンパク質成分が分離 (resolve) または分離 (separate) されたら、タンパク質成分、例えば関心対象の mAb は、1 つまたは複数のキャピラリーにおける関心対象の mAb の相対的位置が維持されるように、キャピラリー内で固定化される。いくつかの態様において、関心対象の mAb は、関心対象の mAb を含む 1 つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の mAb に特異的に結合する 1 つまたは複数の一次抗体と接触させて、関心対象の mAb の存在を検出することによって検出される。いくつかの態様において、本方法は、1 つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程を含む。例えば、キャピラリーにおけるその移動性は、関心対象の mAb の固定化によって損なわれるからである。例えばキャピラリーの長さ方向に沿って一次抗体の結合を検出すれば、試料をそれぞれ質量による分離に供したか、電荷による分離に供したかに依存して、試料中の関心対象の mAb のサイズバリエーションおよび/または電荷バリエーションを検出し、かつ/またはそれらを識別することができる。分子量による分離に関する例として、mAb の断片は小さいほど、キャピラリー内を遠くまで移動すると予想される。いくつかの態様において、試料は複数の、例えば少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、またはそれより多くの関心対象の mAb を含有し、それらのそれぞれを、個々の関心対象の mAb に特異的に結合する一次抗体を用いて検出することができる。いくつかの態様において、本方法は、試料中のモノクローナル抗体のバリエーションの相対量または絶対量を、例えばピーク高さまたはピーク面積の測定によって決定する工程を、さらに含む。ピーク高さまたはピー

10

20

30

40

50



ク面積は、検出される標識一次抗体の量と対応し、それゆえに、どのくらいの量の関心対象のmAbを標識一次抗体の結合に利用できるかに対応する。いくつかの態様において、関心対象のモノクローナル抗体は二重特異性モノクローナル抗体を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体の重鎖に特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体の軽鎖に特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む。二重特異性抗体の場合、一次抗体または抗体は、不要なホモ二量体を含む分子種および所望のヘテロ二量体種を同定するために、異なる重鎖に対するものであってもよい。いくつかの態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体の軽鎖と重鎖の両方に特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の一次抗体は、関心対象の抗体のCDRのうちの1つまたは複数に特異的に結合する少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む。いくつかの態様において、試料は、1つまたは複数の内部標準、例えば分子量標準のラダー、等電点標準のラダー、さらには試料中の関心対象のmAbの量を決定するためのベースラインまたはベンチマークとして使用される標準を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0073】

複数のmAbのmAbカクテル中のmAbを識別できることは、ますます重要になりつつある。というのも、これらの複数成分治療薬は、疾患の処置において効力の増加を示すからである。したがって、これらの系において個々のmAbがどのように挙動するかをモニタリングする改良された方法は、これらマルチmAb治療薬の適合性および安定性の評価において、ますます重要になるだろう。高まりつつあるこのニーズを満たすために、本開示は、試料中の2つ以上のモノクローナル抗体の混合物中のモノクローナル抗体を検出しかつ/またはそれらを識別するための方法を提供する。

#### 【0074】

いくつかの態様において、本方法は、2つ以上の関心対象のmAb（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはさらに多くの関心対象のmAb）を有する試料のタンパク質成分を、キャピラリー電気泳動を使用して、例えば等電点電気泳動によって、1つまたは複数のキャピラリー中で、電荷によって分離する工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第1のモノクローナル抗体に特異的に結合する第1の一次抗体と接触させる工程を含む。いくつかの態様において、本発明は、第1の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第1のモノクローナル抗体を検出する工程を含む。いくつかの態様では、関心対象のmAbの、例えば関心対象のmAb単独の、電荷ベースのプロファイルまたはフィンガープリントを作成して、混合物中のmAbの電荷ベースのプロファイルまたはフィンガープリントとの比較に供することができる。次に、この比較を用いて、関心対象のmAbが混合物中で変化するかどうかを決定することができる。このプロファイルまたはフィンガープリント比較は、混合物中の関心対象のmAbのいずれかまたはすべてについて行うことができる。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第2のモノクローナル抗体に特異的に結合する第2の一次抗体と接触させる工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、第2の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第2のモノクローナル抗体を検出し、試料中のモノクローナル抗体を識別する、工程を含む。これを、試料中の複数の異なるmAbについて続けることができる。例えば、いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象の第3のモノクローナル抗体に特異的に結合する第3の一次抗体と接触させる工程；および第3の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって関心対象の第3のモノクローナル抗体を検出する、工程を含むことができる。さらなる態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、1つまたは複数の追加の関心対象のモノクローナル抗体、例えば第4、第5、第6、第7などの追加の関心対象のモノクローナル抗体に特異的に結合す

る1つまたは複数の追加の一次抗体、例えば第4、第5、第6、第7などの一次抗体と接触させる工程；および1つまたは複数の追加の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによって追加の関心対象のモノクローナル抗体を検出する、工程を含むことができる。いくつかの態様では、試料を複数のキャピラリーに分けて、それらのキャピラリーのそれぞれを異なる一次抗体と接触させて、検出を行う。得られたシグナルは、例えば図12に示すように、後で合わせることができる。一定の態様では、検出を単一のキャピラリーで、例えば後述するようにマルチプレックスで行うことができる。

#### 【0075】

上述したmAbの特性解析に加えて、タンパク質混入物の性質を理解することは、mAb治療薬の開発におけるもう一つの重要な要素である。例えば、残留プロテインA、HCP、残留DNAおよび他の潜在的培養残渣または精製残渣の管理は、通例、原薬の規格の一部である。加えて、そのような管理は、プロセスの一貫性および性能に関して、有益な情報を提供する。したがって本明細書では、宿主細胞タンパク質（HCP）に特異的な、例えば関心対象の混入タンパク質に特異的な、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの抗体を用いた、HCPのためのサイズベースおよび/または電荷ベースの検出方法が開示される。開示する方法では、プロセス試料中の問題となるHCPおよびそれらのさまざまな分子種の検出および可視化が可能である。これらの方法により、低ppmレベルで、所与のHCP不純物のさまざまな分子種を検出し、明らかにすることが可能になる。したがって、本開示のいくつかの局面は、モノクローナル抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出するための方法を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、キャピラリー電気泳動を用いて1つまたは複数のキャピラリー中で試料のタンパク質成分を物理的パラメータによって分離する工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内で試料のタンパク質成分を固定化する工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数のキャピラリー内のタンパク質成分を、関心対象のタンパク質混入物に特異的に結合する1つまたは複数の一次抗体と接触させる工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程であって、それによってモノクローナル抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物を検出する、工程を含む。いくつかの態様において、本方法は、モノクローナル抗体調製物試料中の関心対象のタンパク質混入物のバリエーションを物理的パラメータによって識別する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、関心対象のタンパク質は、1つまたは複数の混入タンパク質であって、1つまたは複数の一次抗体（例えばモノクローナル抗体、さらにはポリクローナル抗体）で検出することができるものである。いくつかの態様において、本方法は、関心対象のタンパク質混入物の電荷バリエーションまたはサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する工程を含む。いくつかの態様では、関心対象のタンパク質混入物の相対量または絶対量を決定することができる。いくつかの態様において、関心対象のタンパク質混入物はPLBD2を含む。

#### 【0076】

開示する方法において使用される試料は、不均質であり、さまざまな構成成分、すなわちさまざまなタンパク質を含有することができる。あるいは、試料は、均一であり、複数の電荷種または分子量種の1つの構成成分または本質的に1つの構成成分を含有することもできる。関心対象のタンパク質、例えばmAbまたは混入タンパク質を検出する前に、分析前処理を試料に対して行いうる。例えば試料は、溶解工程、変性工程、加熱工程、精製工程、沈殿工程、免疫沈降工程、カラムクロマトグラフィー工程、遠心分離などに供することができる。いくつかの態様において、試料の分離と固定化は天然基材（native substrate）上で行いうる。別の態様において、試料は、変性、例えば熱および/または変性剤との接触に供しうる。変性剤は当技術分野において公知である。いくつかの態様において、試料は非還元条件に供しうる。いくつかの態様では、試料を還元条件に供することができる、例えば1つまたは複数の還元剤と接触させることができる。還元剤は当技術分野において公知である。

#### 【0077】

いくつかの態様において、一次抗体は、検出可能なラベルで標識されており、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、検出可能なラベルを検出することを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の一次抗体の結合を検出する工程は、1つまたは複数の一次抗体を、1つまたは複数の一次抗体のうちの少なくとも1つに特異的に結合する二次抗体と、接触させる工程；および二次抗体の結合を検出する工程を含む。いくつかの態様において、二次抗体は検出可能なラベルを有し、検出可能なラベルが検出される。

【0078】

いくつかの態様において、一次抗体および/または二次抗体は、1つまたは複数の検出可能なラベルを含む。いくつかの態様において、検出可能なラベルは、化学発光ラベル、蛍光ラベル、または生物発光ラベルを含む。いくつかの態様において、検出可能なラベルは化学発光ラベルを含む。化学発光ラベルは、光シグナルを与える任意の物質であって、本明細書に開示する方法に従って使用することができるものを含むことができる。当技術分野では、種々のそのような化学発光ラベルが公知である。例えば米国特許第6,689,576号、同第6,395,503号、同第6,087,188号、同第6,287,767号、同第6,165,800号および同第6,126,870号を参照されたい。これらの文献は、参照により、その全体が本明細書に組み入れられる。好適なラベルとして、化学発光による光子放出を誘発するような形で化学発光基質と反応する能力を有する酵素が挙げられる。そのような酵素は、酵素活性によって他の分子における化学発光を誘発する。そのような酵素としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) などのペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ホスファターゼその他の、それぞれに合った化学発光基質を入手することができる酵素を挙げることができる。いくつかの態様において、化学発光ラベルは、イソルミノールラベルなど、さまざまなクラスのルミノールラベルのいずれかから選択することができる。いくつかの態様では、一次抗体として化学発光標識抗体が挙げられる。化学発光基質は、カリフォルニア州フォスターシティのApplied Biosystemsから入手することができるGalacton基質、またはイリノイ州ロックフォードのPierce Biotechnology, Inc. から入手することができるSuperSignal West Femto Maximum Sensitivity基質、または他の好適な基質など、当技術分野において周知である。

【0079】

いくつかの態様において、検出可能なラベルは生物発光化合物を含む。生物発光は生物系に見いだされる化学発光のタイプであり、ここでは触媒タンパク質が科学発光反応の効率を増加させる。生物発光化合物の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。好適な生物発光化合物として、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0080】

いくつかの態様では、検出可能なラベルとして、蛍光色素などの蛍光ラベルが挙げられる。蛍光色素としては、蛍光シグナルを与える任意の物質であって、本明細書に記載する方法および装置に従って使用することができるものを挙げることができる。通例、蛍光色素は、第1波長の光を吸収し、その吸収イベントに応じて第2波長の蛍光を放出する共鳴非局在化系または芳香環系を含む。当技術分野では、広範囲にわたる種々のそのような蛍光色素が公知である。例えば蛍光色素は、さまざまなクラスの蛍光化合物のいずれかから選択することができ、非限定的な例として、キサンテン、ローダミン、フルオレセイン、シアニン、フタロシアニン、スクアライン、BODIPY色素、クマリン、オキサジンおよびカルボピロニン (carbopyronine) が挙げられる。例えば一次抗体および/または二次抗体が蛍光色素などの発蛍光団を含有しているいくつかの態様では、適当な光源でそれらを励起し、それらに特有の蛍光波長に鋭敏な検出器でそれらの蛍光をモニタリングすることによって、それらの蛍光が検出される。いくつかの態様では、一次抗体として蛍光色素標識抗体が挙げられる。

【0081】

異なる関心対象のタンパク質、例えば異なる関心対象のmAbまたは異なる関心対象の混入物タンパク質に結合しまたはそれらと相互作用する2つ以上の異なる一次抗体または二

10

20

30

40

50

次抗体を使用する態様では、異なるタイプの関心対象のタンパク質を、例えば同じ、すなわち単一の、キャピラリー内で、例えば異なる検出可能ラベルを用いて、さらには同じ検出可能ラベルを用いて、マルチプレックスで同時に検出することができる。いくつかの態様では、1つの関心対象のタンパク質に結合し、それと相互作用する、2つ以上の異なる一次抗体および/または二次抗体を、同時に検出することができる。非限定的な例として、関心対象のmAbの重鎖に結合する第1の一次抗体であって第1の検出可能ラベルを有するものを、関心対象のmAbの軽鎖に結合する第2の一次抗体であって、2つのラベルをマルチプレックスで検出できるように第1の検出可能ラベルとは異なる第2の検出可能ラベルを有するものと共に、検出することができる。いくつかの態様では、複数の一次抗体および/または二次抗体を複数の基質と共に使用することで、カラーマルチプレックス化を行うことができる。例えば、使用される異なる化学発光基質は、それらが異なる色の光子を放出するように選択されるだろう。異なる色の選択的検出は、回折格子、プリズム、一連のカラーフィルタ、その他の手段を用いて達成することができる。

#### 【0082】

いくつかの態様において、キャピラリーは、機器および/またはシステムによって自動的に添加されうる分離マトリックスを含みうる。いくつかの態様において、試料は分離に先だってスタッカーマトリックス (stacker matrix) にローディングされる。分離マトリックスは、一態様では、サイズ分離マトリックスであり、従来の電気泳動技法において使用されるポリマーゲルと類似する性質または実質的に同じ性質を有する。分離マトリックスにおけるキャピラリー電気泳動は、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルなどのポリマーゲルにおける分離と類似しており、分子が通過することのできる多孔質の通路を設けることにより、分子は、試料中の分子のサイズに基づいて分離される。分離マトリックスは分子サイズによる分子の分離を可能にする。なぜなら、大きな分子ほど小さな分子よりもゆっくりとマトリックス中を移動することになるからである。いくつかの態様では、1つまたは複数のキャピラリーが分離マトリックスを含む。いくつかの態様では、関心対象のタンパク質を含有する試料が、分子量に基づいて分離 (separate) または分離 (resolve) される。いくつかの態様において、分離マトリックスは、タンパク質を分子量によって分離するように構成されている篩分けマトリックスを含む。いくつかの態様では、試料のタンパク質成分が分子量によって分離され、本方法は、関心対象のモノクローナル抗体のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。いくつかの態様では、試料のタンパク質成分が分子量によって分離され、本方法は、関心対象の混入タンパク質のサイズバリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。

#### 【0083】

当技術分野では多種多様な固相基材が、例えばポリアクリルアミドゲルなどのゲルが、公知である。いくつかの態様において1つまたは複数の関心対象のタンパク質を分離 (resolve) する工程は、ポリマーゲルにおける試料の電気泳動を含む。ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルなどのポリマーゲルにおける電気泳動は、分子を、その分子のサイズに基づいて分離する。ポリマーゲルは、分子が通過することのできる多孔質の通路を与える。ポリマーゲルは分子サイズによる分子の分離を可能にする。なぜなら、大きな分子ほど小さな分子よりもゆっくりとゲル中を移動することになるからである。

#### 【0084】

いくつかの態様では、関心対象のタンパク質を含有する試料が、試料の構成成分の電荷に基づいて分離 (separate) または分離 (resolve) される。いくつかの態様では、試料のタンパク質成分が電荷によって分離され、本方法は、関心対象のモノクローナル抗体の電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。いくつかの態様では、試料のタンパク質成分が電荷によって分離され、本方法は、関心対象の混入タンパク質の電荷バリエーションを検出しかつ/またはそれらを識別する方法である。いくつかの態様において、分離マトリックスは両性担体を含む。いくつかの態様において、電荷によって試料を分離する工程は、試料の等電点電気泳動 (IEF) を含む。例えば電場中で、分子は、その分子が持つ正味の電荷とは反対の電荷を持つ極 (カソードまたはアノード) に向かっ

10

20

30

40

50

て移動することになる。この正味の電荷は、一つには、その分子が移動している培地のpHに依存する。一般的な電気泳動手順の一つは、電場のそれぞれの端部で異なるpH値を有する溶液を確立して、それらの間にpHの勾配範囲を設けることである。一定のpHでは、分子の等電点が得られ、その分子は正味の電荷を持たない。分子がpH勾配を横切ると、分子はその正味の電荷がゼロになるスポット（すなわちその等電点）に到達し、その後、その電場中で動かなくなる。したがってこの電気泳動手順は、分子をそれぞれの異なる等電点に従って分離する。

#### 【 0 0 8 5 】

いくつかの態様において、例えば分離（resolve）が等電点電気泳動によって行われる場合は、両性電解質試薬を、キャピラリー電気泳動装置の1つまたは複数のキャピラリーにローディングすることができる。両性電解質試薬は、ある範囲の異なる等電点を有する分子の混合物である。典型的な両性電解質試薬は、英国バッキンガムシャーのAmersham Biosciencesから入手することができるPharmalyte（商標）およびAmpholine（商標）である。

10

#### 【 0 0 8 6 】

いくつかの態様では、分離が完了したら、分離された試料の構成成分（例えば関心対象のタンパク質、例えば関心対象のmAbまたは関心対象の混入タンパク質）は、任意の適切な方法を用いて、例えば限定するわけではないが化学処理、光化学処理および熱処理などを用いて、1つまたは複数のキャピラリーの壁に固定化される。いくつかの態様において、分離された試料の構成成分は、分子が電気泳動によって、例えばサイズまたは電荷によって分離された後に、CEシステムの1つまたは複数のキャピラリーに固定化される。いくつかの態様において、固定化は、光固定化、化学固定化、または熱固定化を含む。固定化は、共有結合によるか、または非共有結合的手段、例えば疎水相互作用またはイオン相互作用によることができる。一定の態様において、関心対象のタンパク質は、1つまたは複数の反応性部分を用いて固定化される。反応性部分は、試料の個々の分子の対応する反応性基と共有結合を形成する能力を有する任意の反応性基を含むことができる。したがって反応性部分は、それが本明細書に開示する方法と適合する限り、当技術分野において公知の任意の反応性基を含むことができる。いくつかの態様において、反応性部分は、関心対象のタンパク質の対応する反応性基、例えば関心対象のmAbまたは関心対象の混入タンパク質の対応する反応性基と共有結合を形成する能力を有する反応性基を含む。

20

30

#### 【 0 0 8 7 】

反応性部分は、キャピラリーに直接的または間接的に取り付けることができる。いくつかの態様において、反応性部分は、溶解状態または懸濁状態で供給することができ、活性化されると、キャピラリーの壁と試料中の分子との間に架橋を形成しうる。例えば一態様において、固定化は、分離された試料とキャピラリーを紫外（UV）光にさらすことによって起こり、これは関心対象のタンパク質（試料中に存在する場合）および試料中の分子をキャピラリーの壁に固定化するのに役立つ。固定化は、共有結合によるか、または非共有結合的手段、例えば疎水相互作用またはイオン相互作用によることができる。別の態様において、反応性部分は、キャピラリー中の分離（resolve）された1つまたは複数の関心対象のタンパク質を共有結合で固定化するために使用することができる。反応性部分は、キャピラリーに（例えばキャピラリーチューブの壁に）直接的または間接的に取り付けることができる。いくつかの態様において、反応性部分は、溶解状態または懸濁状態で供給することができ、活性化されると、キャピラリーの壁と試料中の分子との間に架橋を形成するように構成されうる。反応性部分はキャピラリーの内面を覆うか、またはキャピラリー中の線状ポリマー上または架橋ポリマー上に存在することができ、それらは、活性化前および/もしくは活性化後にキャピラリーの壁に連結されても、連結されなくてもよい。反応性部分は、試料の個々の分子、例えば上述したものなどの対応する反応性基と共有結合を形成する能力を有する任意の反応性基であることができ、かつ/またはそのような反応性基を含むことができる。

40

#### 【 0 0 8 8 】

50

いくつかの態様において、反応性部分は、疎水相互作用、イオン相互作用、水素結合などによって関心対象のタンパク質に付着する官能性に変換することができる官能基を含む。いくつかの態様において、そのような反応性部分は、関心対象のタンパク質をキャピラリーの表面におよび/またはキャピラリーの表面に取り付けられた粒子の表面に固定化するために、UV光、レーザー、温度、または他の任意のエネルギー源で活性化される。いくつかの態様において、キャピラリーの表面は、温度を変化させたときの表面の疎水性の変化を可能にする熱応答性ポリマーで官能化される。いくつかの態様において、関心対象のタンパク質は、キャピラリー内の温度が一定の温度に達したときに温度応答性ポリマーの疎水性を増加させることによって、そのような表面に固定化される。

#### 【0089】

当技術分野では、2つの分子を共有結合で一つに連結するのに適した多種多様な反応性部分が公知である。例えば反応性部分はタンパク質の炭素-水素(C-H)結合に結合することができる。多くの分離媒体もC-H結合を持つ構成成分を含有するので、スルフヒドリル(S-H)基と反応する化学的性質は、S-H基が大半の分離媒体構成成分と比べてもっぱらタンパク質に見いだされる点で、有利でありうる。好適な反応性部分としては、光反応性基、化学反応性基および熱反応性基が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。キャピラリー系における光固定化は1つまたは複数の光反応性基の活性化によって達成される。光反応性基には、外部エネルギー源によって活性化されると、他の分子と共有結合を形成する1つまたは複数の潜在性光反応性基(latent photoreactive group)が含まれる。例えば米国特許第5,002,582号および同第6,254,634号参照。光反応性基は、電磁エネルギーを吸収すると、フリーラジカル、特にナイトレン、カルベンおよび励起状態のケトンなどといった活性種を生成する。電磁スペクトルのさまざまな部分に応答する光反応性基、例えば電磁スペクトルの紫外部分、赤外部分および可視部分に応答するものなどを選ぶことができる。例えば、光源に曝露されると、光反応性基は活性化されて、隣接する分子と共有結合を形成することができる。好適な光反応性基として、アリアルケトン、アジド、ジアゾ、ジアジリンおよびキノンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、試料の分離(resolve)された関心対象のタンパク質は、等電点電気泳動により、CEシステムのキャピラリー中で固定化される。

#### 【0090】

検出可能なラベルの検出は、それが本明細書に記載する方法と適合する限り、当技術分野において公知の任意の方法によることができる。ラベルの検出は、従来の方法および機器を用いてシグナルをモニタリングすることによって行うことができ、非限定的な例として、光検出器、光検出器のアレイ、電荷結合素子(CCD)アレイなどが挙げられる。通例、検出可能なラベルを検出する工程は、キャピラリーをイメージングする工程が含まれる。いくつかの態様では、キャピラリーの全長をイメージングすることができる。あるいは、キャピラリーの特別なパートまたは部分をイメージングすることもできる。

#### 【0091】

本明細書に記載する方法の工程の順序の変更は、当業者にはすぐに思いつくだらう。例えば試料を分離してから、関心対象のタンパク質を一次抗体と接触させる前に、関心対象のタンパク質をキャピラリーにおけるそれぞれの分離(resolve)された場所で固定化することができる。いくつかの態様では、一次抗体を関心対象のタンパク質と接触させて複合体を形成させてから、その複合体がCEシステムのキャピラリー中で分離(resolve)される。いくつかの態様では、一次抗体を試料に事前に負荷してから、システムにローディングすることができるだろう。別の例として、等電点電気泳動などの分離(resolve)工程は、化学発光試薬を供給した後で、適用することができる。

#### 【0092】

いくつかの態様において、試料は内部標準を含む。内部標準は等電点または分子量に関して分離を較正するのに役立つ。IEF用の内部標準は当技術分野において周知である。例えばShimura, K., Kamiya, K., Matsumoto, H., and K. Kasai (2002) Fluorescence-Labeled Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing, Analytical Chemistry v74:104

10

20

30

40

50

6-1053および米国特許第5,866,683号参照。蛍光によって検出される標準へは、化学発光の前または後に照射を行うことができ、一般に、化学発光と同時にには行われたい。いくつかの態様において、関心対象のタンパク質および標準は蛍光によって検出される。関心対象のタンパク質と標準は、関心対象のタンパク質と標準とを独立して検出することができるように、それぞれが別々の蛍光波長で検出可能である蛍光色素で、それぞれを標識することができる。

#### 【0093】

いくつかの態様において、内部標準は、精製された形態の関心対象のタンパク質そのものであることができ、一般的にはこれを関心対象のタンパク質とは何らかの方法で区別できるようにする。精製された形態の関心対象のタンパク質を得る方法としては、自然界からの精製、実験室で生育した生物からの精製（例えば化学合成による）などの方法を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。内部標準を特徴づける特質は、任意の適切な変化であってよく、これには例えば色素標識、放射標識、または電気泳動分離中の標準の移動度を関心対象のタンパク質からは離れるように調整することが含まれるが、それらに限定されるわけではない。例えば標準は、関心対象のタンパク質と比較して標準の電荷、質量および/または長さを（例えば欠失、融合および/または化学修飾などによって）変化させるような、関心対象のタンパク質の修飾を含有することができる。したがって、関心対象のタンパク質と内部標準は、それぞれが別々の蛍光波長で検出可能である蛍光色素で、それぞれを標識することができる、それによって、関心対象のタンパク質と標準とを独立して検出することができるようになる。いくつかの例において、内部標準は関心対象のタンパク質とは異なるが、その挙動は関心対象のタンパク質と同様または同じであって、適切な比較測定を可能にする。いくつかの態様において、使用に適した標準は、米国特許出願公開第2007/0062813号に記載されているもののいずれかであることができ、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

#### 【0094】

当業者には理解されるであろうが、キャピラリーに試料をローディングする方法は事実上どれでも実施しうる。例えば試料はキャピラリーの一端にローディングすることができる。いくつかの態様では、試料が流体力学的流れ（hydrodynamic flow）によってキャピラリーの一端にローディングされる。例えば流体路がキャピラリーである態様では、試料を流体力学的流れによってキャピラリーの一端にローディングすることができ、したがってキャピラリーはマイクロピペットのように使用される。いくつかの態様において、例えばキャピラリーにゲルが充填されていて、それゆえに流体力学的流れに対する抵抗が高い場合には、試料を電気泳動によってキャピラリーにローディングすることができる。

#### 【0095】

キャピラリーは、液体または溶解した分子が流れることのできる任意の構造を含みうる。したがってキャピラリーは、それが本方法と適合する限り、当技術分野において公知の任意の構造を含みうる。いくつかの態様において、キャピラリーは液体または溶解した分子が流れることのできる穴またはチャネルである。いくつかの態様において、キャピラリーは液体または溶解した分子が流れることのできる透過性材料中の通路である。

#### 【0096】

キャピラリーは、キャピラリー内の関心対象のタンパク質を検出することが可能な任意の材料を含む。キャピラリーは、ガラス、プラスチック、シリコン、溶融シリカ、ゲルなど、任意の好都合な材料を含む。いくつかの態様において、本方法は複数のキャピラリーを使用する。複数のキャピラリーにより、複数の試料を同時に分析することが可能になる。

#### 【0097】

キャピラリーの寸法、幅、深さ、および断面はさまざまであることができ、形状もまた、例えば円形、台形、矩形などであることができる。キャピラリーは、直線、円形、蛇行状などであることができる。後述するように、流体路の長さは、一つには、試料サイズや、関心対象のタンパク質を分離（resolve）するために必要な試料分離の程度などといっ

10

20

30

40

50

た因子に依存する。

【0098】

いくつかの態様において、キャピラリーは穴のあいたチューブを含む。いくつかの態様において、本方法は複数のキャピラリーを使用する。好適なサイズとして、限定するわけではないが、約10～約1000  $\mu\text{m}$ の内径を有するキャピラリーが挙げられ、より典型的には、約25～約400  $\mu\text{m}$ の内径を有するキャピラリーを利用することができる。直径がこれより小さなキャピラリーでは、比較的低い試料負荷量が使用され、口径が比較的大きいキャピラリーを使用すれば、比較的高い試料負荷量が可能になり、改良されたシグナル検出をもたらすことができる。

【0099】

キャピラリーはさまざまな長さを有することができる。好適な長さとして、限定するわけではないが、長さ約2～20cmのキャピラリーが挙げられるが、多少短いキャピラリーや多少長いキャピラリーも使用することができる。いくつかの態様において、キャピラリーは長さが約3、4、5または6cmである。これより長いキャピラリーでは、通例、複雑な混合物の分離が良くなり、分解能が改良される。長いキャピラリーは、低存在量の関心対象のタンパク質を分離 (resolve) する際に特に役立つ。

【0100】

一般に、キャピラリーは溶融シリカでできているが、プラスチックキャピラリーおよびPYREX (すなわち非晶質ガラス) も利用することができる。上述のように、キャピラリーは円形または管状の形状を有する必要はない。他の形状も、それが本明細書に記載する方法と適合する限り、使用しうる。

【0101】

いくつかの態様において、キャピラリーはチャンネルであることができる。いくつかの態様において、本方法は、複数のチャンネルを使用することができる。いくつかの態様において、キャピラリーはマイクロ流体装置中のチャンネルであることができる。マイクロ流体工学は、多種多様な操作を行うために、基材中のチャンネルを使用する。マイクロ流体装置は、基材の表面に刻まれた1つまたは複数のチャンネルを含むことができる。マイクロ流体装置は、固形不活性基材から、そしていくつかの態様ではチップの形態で、得ることができる。マイクロ流体装置の寸法は決定的な問題ではないが、いくつかの態様において、寸法は、厚さが約100  $\mu\text{m}$ ～約5mm程度、一辺が約1センチメートル～約20センチメートルほどである。好適なサイズとしては、限定するわけではないが、約5  $\mu\text{m}$ ～約200  $\mu\text{m}$ の深さを有するチャンネルが挙げられ、より典型的には、約20  $\mu\text{m}$ ～約50  $\mu\text{m}$ の深さを有するものを利用することができる。マイクロチャンネルまたはナノチャンネルなど、これより小さなチャンネルも、それらが本方法と適合する限り、使用することができる。

【0102】

以上、具体的な態様を詳しく説明したが、この説明は単なる例示にすぎない。したがって、上述した多くの局面は、別段の明示がある場合を除き、必須の要素または本質的要素であることを意図していないことを理解すべきである。当業者は、本開示の助けを借りて、上述したものに加えて、本願請求項に規定する態様の要旨および範囲から逸脱することなく、例示的態様の開示した局面の改変および例示的態様の開示した局面に対応する等価な構成要素または行為を為すことができ、本願請求項の範囲は、そのような改変および等価な構造が包含されるように、最も広い解釈が与えられるべきである。

【0103】

一定の態様の特定の特徴を例示するために、以下に実施例を挙げる。ただし、以下に述べる特定の特徴は、本発明の範囲に対する限定であるとみなすべきではなく、むしろ当業者がそこから均等物を認識することになる実例とみなすべきである。

【実施例】

【0104】

実施例1：CE-ウェスタンによるmAb試料中のサイズバリエーションの定量

mAb1の精製抗体調製物を含有する試料を、ProteinSimple (カリフォルニア州サンノゼ

10

20

30

40

50



）から入手したPeggySue装置を用いて、分子量によるCE分離に供した（図1参照）。結果として得られた分離を、抗カッパ抗体および抗FC抗体（図2A）を使用することによって、または総タンパク質アッセイ（下記参照）によって、分析した。図2Aに示すように、mAb1の軽鎖および重鎖に対する抗体を使用することで、試料中のサイズバリエーションを分子量によって同定することができ、サイズバリエーションのそれぞれの相対量も決定することができた。図2Bに示すように、図2Aに示した結果は、総タンパク質アッセイで得られた結果、すなわち試料中の任意のタンパク質からの蛍光シグナルを決定した場合と同じであった。図2Bを図2Aと組み合わせると、抗体検出を用いてサイズバリエーションを定量できること、および抗体ベースの検出におけるいかなるバイアスも総タンパク質アッセイを用いて確認できることが実証される。さらにまた、この結果は、サイズベースのCE-ウェスタンがmAb試料中のサイズバリエーションを高感度に定量できることを実証している。図3Aおよび図3Bは検出された抗体またはその断片の相対量を示している。

10

20

30

40

50

#### 【0105】

##### サイズアッセイ

標準蛍光ミックス、DTT、ラダー、およびルミノールの再構成は、製造者の説明書に従って行った。標準的な試料調製条件は、試料を95℃で5分間加熱することである。必要な分解能を得るために、試料を80℃で10分間加熱した。さらに、分解能を改良するために、スタッキングおよび試料ローディング時間を変えることによって、機器パラメータを最適化した。製造者は、15秒間のスタッキングマトリックスとそれに続く9秒間の試料ローディング時間を推奨しているが、ここでの標準条件は12秒間のスタッキングマトリックスとそれに続く6秒間の試料ローディング時間であり、これにより、抗体サイズバリエーション特性解析における150kDaピークと125kDaピークの間の分解能が著しく改良された。

#### 【0106】

##### 総タンパク質アッセイ：

本明細書に開示する最適化された方法では、総タンパク質アッセイモジュールを使用する必要はなく、サイズアッセイモジュールでの試料のオンラインビオチン化を行った。これにより、総タンパク質アッセイをサイズアッセイと並行して同じサイクルで行うことができたが、これは他の方法では不可能である。

#### 【0107】

第2のアプローチとして、方法の感度を改良するために、オンラインビオチン化の代わりにプレビオチン化試料を使用した。これは、感度の改良だけでなく、総タンパク質キットおよび総タンパク質モジュールの使用を排除することにより、サイズアッセイと並行して同じサイクル内で総タンパク質アッセイを行うことも可能にする。

#### 【0108】

##### 実施例2：CE-ウェスタンとCE-SDSの比較

mAb1を含有する試料を、CE-SDS分析またはサイズベースのCE-ウェスタン分析のどちらかに供した。図4に示すように、サイズベースのCE-ウェスタン分析ではCE-SDS分析と同等な分解能が得られた。それだけでなく、サイズベースのCE-ウェスタン分析では2つの異なる抗体を使用したので、どのサイズバリエーションが分析中のどのピークを生じさせているかを決定することが可能である（右側の図は、分離（resolve）された試料をそれぞれ抗カッパ抗体または抗FC抗体でプローブした2つのトレースの合成である）。これらの結果は、サイズベースのCE-ウェスタンがmAbサイズバリエーションの分析においてCE-SDSの実行可能な代替法であることを実証している。

#### 【0109】

##### 実施例3：mAb調製物における試料混入物の決定

混入物PLBD2を含んでいる抗体調製物を、非還元条件下（図5A）および還元条件下（図5B）で、サイズベースのCE-ウェスタンによって分析した。図5Aは、非還元条件下での分析のグラフであり、mAb2プロセスプールが組換えPLBD2の場合と非常によく似たPLBD2種を有することを示している。図5Bは、還元条件下での分析のグラフであり、mAb2プロセスプールが組換えPLBD2の場合と非常によく似たPLBD2種を有することを示している。図6は、還

元条件および非還元条件におけるPLBD2の濃度依存的分析を示す一組のグラフであり、これは、サイズベースのCE-ウェスタンが、mAb調製物混入物の検出および定量に関して、ELISA測定と同等であることを実証している。それだけでなく、ELISAとは異なり、混入タンパク質を分子量で分離 (resolve) することができるので、混入全体の一部を担う個々の分子種を決定することができる。

#### 【0110】

実施例4：電荷ベースのCE-ウェスタンによる分離および検出

電荷ベースのCE-ウェスタン (iCIEF-ウェスタン；図7参照) がmAb電荷バリエーションの分離 (resolve) においてiCIEFと同等であることを実証するために、mAb3を含む試料をiCIEFおよびiCIEF-ウェスタン分析に供した。図8に示すように、iCIEFおよびiCIEF-ウェスタンは、ある抗体調製物について同等の結果を与えた。この結果は、抗体の分析に関して、iCIEF-ウェスタンがiCIEFの実行可能な代替法であることを実証している。それだけでなく、図9Aおよび図9Bに示すように、iCIEF-ウェスタンでは特定のバリエーションに対する抗体を使用することができるので、バリエーションのレベルおよび実体を同時に決定することができる。

#### 【0111】

電荷アッセイ

プレミックスG2、DTT、およびラダーの再構成は製造者に提案されたとおりに行った。標準的なプロトコールによれば、試料希釈は、試料希釈剤およびDMSO阻害剤混合物で行うことが推奨されている。しかし、本明細書に開示する最適化された方法では、試料をCHAPS/溶解緩衝液で希釈してから、プレミックスG2およびpIラダーミックスを添加する。さらに、高塩基性pIの分子で作業する場合は、電荷バリエーションプロファイルを検出ウィンドウ内に収めるために、TEMEDを添加剤として試料調製物に含めた。本方法の感度は、必要に応じて電荷ルミノール (charge luminol) の代わりにサイズルミノール (size luminol) を用いることによって、さらに改良された。

#### 【0112】

最適化された方法を用いて、複合製品内の個々の薬剤を検出し、定量した。さらに、リガンドへの電荷バリエーションの結合の相違を理解するために本方法を使用した。

#### 【0113】

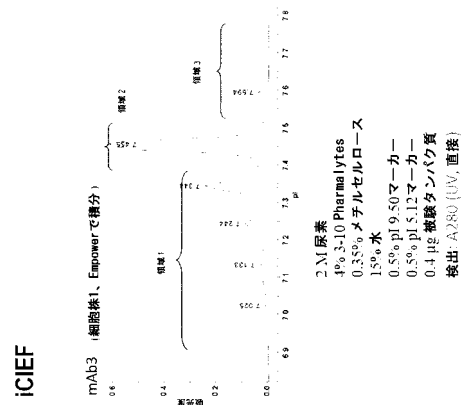
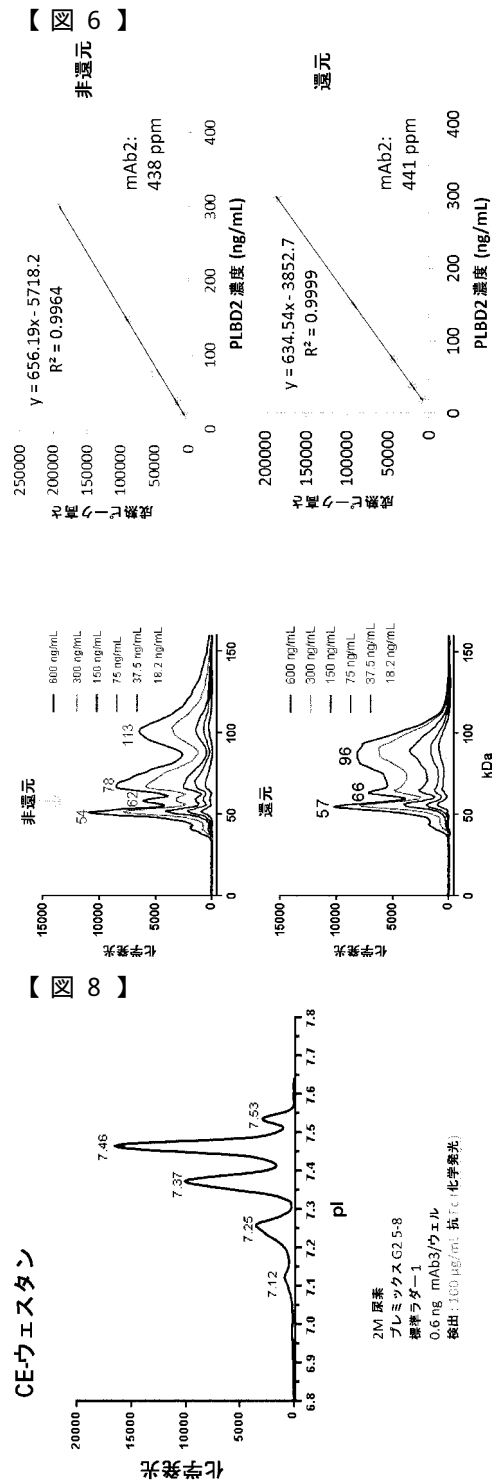
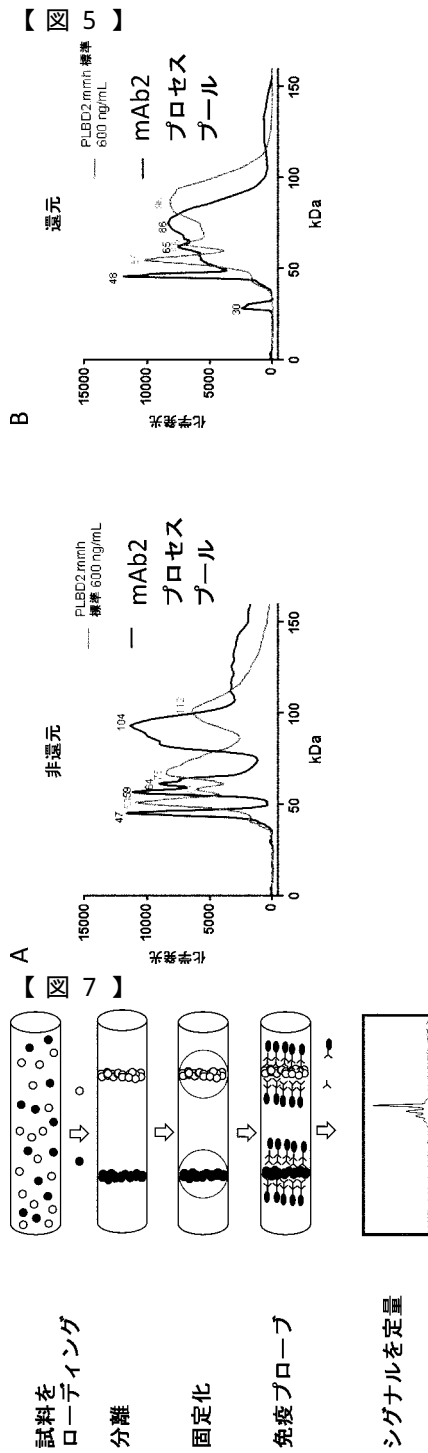
実施例5：複雑なmAb混合物の分析

本明細書に開示するiCIEF-ウェスタン法は、複雑な抗体混合物を分析するための強力なツールになる。図10は、iCIEFを用いて分析された三成分抗体混合薬では、個々の抗体電荷バリエーションのpI範囲がオーバーラップしていることを示す。この結果は、pIがオーバーラップしている可能性がある複雑な抗体調製物の分析には、iCIEFは能力不足であることを実証している。しかし、図11に示すように、電荷ベースのCE-ウェスタン (iCIEF-ウェスタン) を利用すれば、三成分抗体混合薬の個々の分子種を識別することができる。図12は、iCIEF-ウェスタンには複合製剤中の個々の抗体を選択的に検出する能力があることを示す合成グラフである。図13に示されるとおり、mAb4の定量分析は、iCIEFおよびiCIEF-ウェスタンを用いて単体で評価した場合と、iCIEF-ウェスタンを用いて混合物として評価した場合とで、類似している。

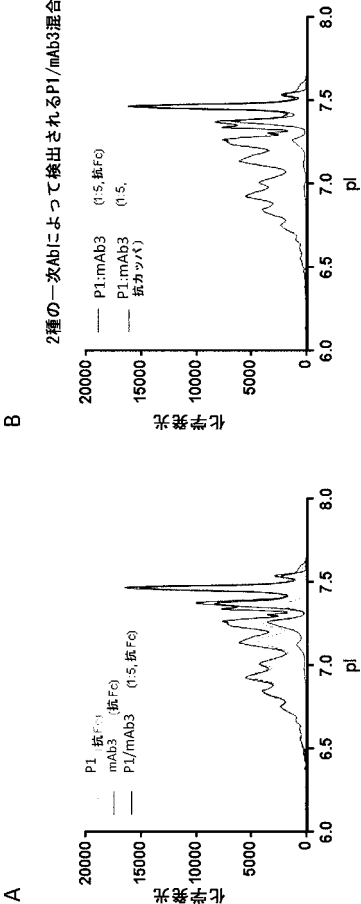
#### 【0114】

本発明の範囲は、本明細書に記載した具体的態様によって限定されない。事実、本明細書に記載するものに加えて、本発明のさまざまな変更態様が、上記の説明および添付の図面から当業者には明白になるであろう。そのような変更態様は、添付の特許請求の範囲に包含されるものとする。

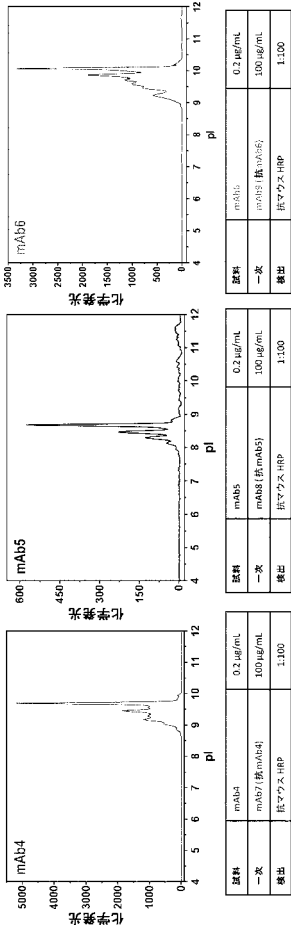




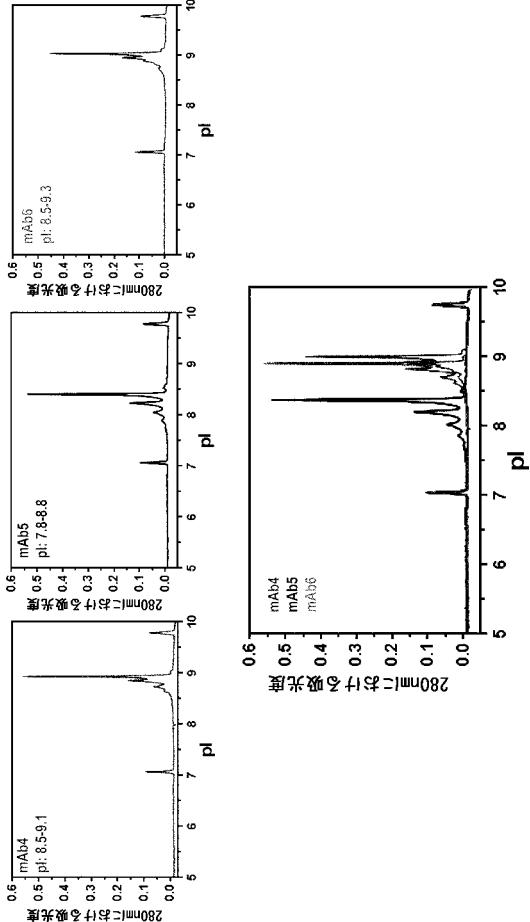
【図 9】



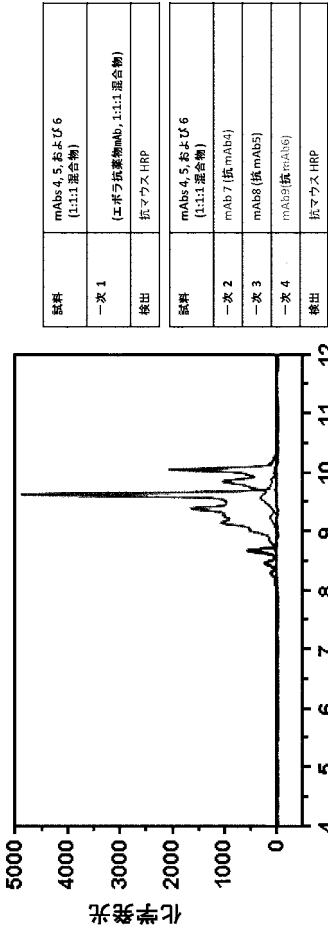
【図 11】

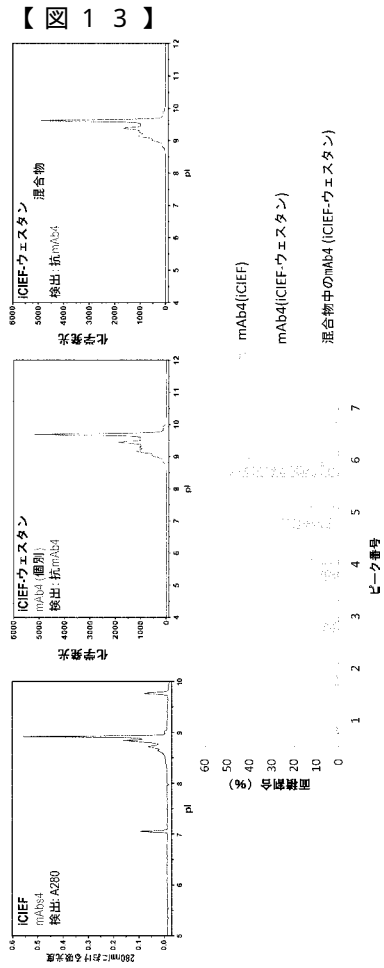


【図 10】



【図 12】





## フロントページの続き

- (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 パラッカル ニシャ  
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロ  
ード 7 7 7
- (72)発明者 ルー クン  
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロ  
ード 7 7 7
- (72)発明者 ドゥリパラ ガンガーダル  
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロ  
ード 7 7 7

【外国語明細書】  
2020101545000001.pdf